



# Rôle du VEGF dans la régulation de la synapse glutamatergique

Pierre De Rossi

## ► To cite this version:

Pierre De Rossi. Rôle du VEGF dans la régulation de la synapse glutamatergique. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10279 . tel-01067090

**HAL Id: tel-01067090**

**<https://theses.hal.science/tel-01067090>**

Submitted on 22 Sep 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre 279 - 2013

Année 2013

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE  
**Neurosciences et Cognition (NsCo)**

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement **le 17 Décembre 2013**

par

**Pierre DE ROSSI**

**TITRE : Rôle du VEGF dans la régulation de la synapse glutamatergique**

Directeur de thèse : **Docteur Claire MEISSIREL**

JURY : **Dr Fanny MANN** (Rapporteur)  
**Pr Bruno GONZALEZ** (Rapporteur)  
**Dr Laurent GROC**  
**Pr Alain BUISSON**  
**Pr Jean-Louis BESSEREAU**  
**Dr Claire MEISSIREL**



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## Président de l'Université

**M. François-Noël GILLY**

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

## *COMPOSANTES SANTE*

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

## *COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE*

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE





# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Claire Meissirel pour m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse. Les longues discussions et réflexions que nous avons pu avoir au cours de ces cinq années ont permis d'aiguiser mon sens critique et je l'espère d'améliorer mon esprit scientifique. Merci pour ta patience et ton implication qui m'ont amené jusqu'ici. Merci également au Dr Paul Salin pour son aide sur le projet, ses conseils et sa disponibilité pour l'ensemble de nos interrogations. Enfin, merci aux Dr Laurent Seugnet et Dr Gael Malleret d'avoir pris part à ce projet en amenant leurs connaissances et leur aide à notre projet.

Merci au Pr Jérôme Honnorat de m'avoir accueilli dans son laboratoire depuis mon master 1 et pour son soutien jusqu'à l'aboutissement de ce travail et mon départ vers de nouveaux horizons. Je remercie également Josiane Moiret, notre gestionnaire, pour sa bienveillance, bien cachée, mais réellement présente.

Je remercie chaleureusement le Dr Fanny Mann et le Pr Bruno Gonzalez d'avoir accepté d'évaluer ce travail ainsi que pour leurs conseils et discussions en différentes occasions tout au long de ma thèse. Je remercie également le Pr Jean-Louis Bessereau d'avoir présidé le jury de thèse, ainsi que le Dr Laurent Groc d'avoir fait le déplacement à Lyon pour participer à ce jury.

Je remercie le Pr Paul de Koninck et le Pr Alain Buisson d'avoir participé à mon comité de suivi de thèse, et pour Alain au jury de thèse, ainsi que pour leur soutien et leur aide dans ma recherche de post-doc.

Je remercie l'ensemble de l'équipe ONCOFLAM (ex-U842) avec qui j'ai partagé mon quotidien pendant près de cinq ans. Merci à Naura Chounlamountri pour son aide technique et sa bonne humeur quotidienne, ne change rien Naura, tu es géniale !!! Merci au bureau, avec Chantal, Nicole, Claire, Naura, Thomas la première année et Aubin pendant trois ans, d'avoir supporté ma bougeote pathologique, mes « blagues » et mon rire. Merci à Chantal Watrin, Naura Chounlamountri, Sylvie Cavagna, Dr Monique Touret et Dr Véronique Rogemond pour leur soutien technique qui a été déterminant à chaque étape de ce travail. Merci d'avoir partagé votre savoir et les petits trucs qui font marcher les manips ! Merci également pour votre joie d'aider les étudiants en détresse et pour m'avoir rappelé de mettre ma blouse.

Merci aux Dr Nicole Thomasset, Dr Nelly Noraz, Dr Véronique Pellier-Monnin, Dr Pascale Giraudon, Dr Roger Besançon, Dr Jean-François Gherzi-Egea et Dr Nathalie Strazielle pour leurs enseignements et leur disponibilité, leurs conseils, leur second degré et tout le reste.

Big up pour l'ensemble des étudiants et post-doc avec qui nous avons partagé paillasses et bières, pas toujours dans le bon ordre !!! Donc merci à Aurélien B, Romain, Marie, Charlotte, Adeline, Alice, Joss, Aurélien V, Michel, Thomas, Sébastien, Gaëlle, Ingrid, Stéphanie, Nicolas, Laurent, Aude, Bastien et tous les autres pour les bons moments que nous avons partagé tous ensemble et qui font du labo un lieu de vie plus que de travail !!!

Comment oublier mes deux potes du labo avec qui science rime aussi avec fastfood, junk food, youtube, bières, worms ou encore Unreal Tournament !!! Dr Olivier Pascal et Dr Aubin Moutal, j'espère pouvoir échanger avec vous encore longtemps !!! Il paraît que Chicago est très sympa... Juste si vous ne savez pas où passer vos prochaines vacances...

Merci à l'ensemble des étudiants du CRNL. Ensemble nous avons créé les EtuCRNL, j'espère que les événements seront pérennisés et que la bonne humeur entre vous continuera d'exister.

Un grand merci à ma famille d'avoir soutenu mon choix d'étude, d'avoir été là à tous les instants. Papa, Maman, Mamie, Tatie et Papou de m'avoir poussé à aller plus loin, et Mathieu et Pauline d'avoir été là. Des énormes bisous à ma petite puce, Eva, qui partage ma vie depuis mon arrivée à Lyon et qui a toujours été là pour moi.

Enfin pour finir, merci à l'ensemble de mes potes de Lyon et d'ailleurs pour tout. Romain et Jocelyn, mes deux acolytes de l'ouest avec qui on se suit depuis la première année de médecine. Merci pour la cohabitation, les soirées, les concerts, le Hellfest, les restos, les blagues gays, vos mamans et tout et tout !!! Egalement Sylvain et Elsa, Alicia, Céline, Simon, Mathieu, Boubou, et tous les autres copains du beer's band, les amis du picoloc bar, et autres lieux qui ont rythmé ma vie sur Lyon. La chaudateam de Nantes avec Kent, Jojo l'asticot et les chaudadoudous !!! Vous êtes tous énormes, le départ sans vous va être dur... Come Taste The Band, mon groupe de musique, avec qui j'ai pu m'aérer la tête et partager plusieurs scènes sur Lyon, notamment au Ninkasi Kao et au Transbo, et autant de souvenirs inoubliables. En particulier Fredo, Flavien et Aurélien avec qui nous avons partagé tellement !!! Merci à mes colocs de m'avoir supporté pendant 2 ans ½, Marie, Christophe, Angy, Rémi, Carine, Laura, Maïlys, Baptiste, Xavier, Patrizio et mon petit Antonin. Vous allez me manquer !!! L'équipe de waterpolo de Rillieux Natation pour les entraînements, les matchs, les 3<sup>e</sup> mi-temps, les barbus... Rillieux Rillieux HAHAHA !!! Je ne peux malheureusement pas faire de liste exhaustive, mais Lyon regorge de personnes formidables, et vous allez tous me manquer.





# Liste des Abréviations

Akt ou PKB : Protéine Kinase B  
 AMPA : Acide Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Méthyl-4-Isoxazolepropionique  
 AMPAR : Récepteur AMPA  
 BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor  
 CA : Corne d'Ammon  
 CaMKII : Calcium/Calmoduline-dependent Kinase 2  
 DAG : Diacyl Glycerol  
 DG : Gyrus Denté  
 ERK : Extracellular Signal-Regulated Kinases  
 GTP : Guanosine Triphosphate  
 GTPase : Enzyme dégradant le GTP  
 HIF : Hypoxia Induced Factor  
 HRE : Hypoxia Response Element  
 HSPG : Héparane-Sulfate Protéoglycane  
 IP3 : Inositol Triphosphate  
 LTD : Dépression à Long Terme (Long Term Depression)  
 LTP : Potentialisation à Long Terme (Long Term Potentiation)  
 MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases  
 NMDA : N-methyl-D-Aspartate  
 NMDAR : Récepteurs NMDA  
 NO : Nitric Oxyde  
 NOS : Nitric Oxyde Synthase  
 Nrp : Neuropiline  
 PDZ : PSD = PSD-95/DLG (Discs Large)/ZO-1 (Zonula Occludens)  
 PI3K : Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase  
 PIP2 : Phosphatidylinositol (4,5)-Bisphosphate  
 PIP3 : Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphate  
 PKA : Protéine Kinase A  
 PKC : Protéine Kinase C  
 PLC : Phospholipase C  
 PlGF : Placental Growth Factor  
 PSD : Post-Synaptic Domain  
 SH2 : Src Homology Domain 2  
 VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor  
 VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor



# Liste des Figures

## Introduction :

Figure 1 : Similitudes anatomiques, cellulaires et moléculaires des systèmes nerveux et vasculaire

Figure 2 : Signaux communs de guidage des systèmes nerveux et vasculaire (Carmeliet et Tessier-Lavigne, 2005)

Figure 3 : Le VEGF et ses récepteurs

Figure 4 : Structure des récepteurs au VEGF et voies de signalisation activées par VEGFR2

Figure 5 : Localisation des récepteurs au VEGF chez l'embryon et chez l'adulte

Figure 6 : Récepteurs au glutamate et hippocampe

Figure 7 : La densité post-synaptique (PSD)

Figure 8 : Les récepteurs NMDA

Figure 9 : Localisation des récepteurs NMDAR2A et NMDAR2B au cours du développement

Figure 10 : Induction et expression de la LTP dans l'hippocampe

## Résultats 1<sup>ère</sup> partie: VEGF modulates NMDA receptor function and synaptic localization in the hippocampus

Figure 1 : VEGF and Flk1 expression in hippocampal CA1 and CA3 regions

Figure 2 : VEGF-induced increase in NMDAR-mediated synaptic transmission in hippocampal CA1 and CA3 pyramidal cells

Figure 3 : VEGF-dependent increase in NMDAR-mediated synaptic responses involves NMDAR2B

Figure 4 : Impact of VEGF or/and NMDA treatments on hippocampal cell viability

Figure 5 : Combined VEGF and NMDA treatment results in synapse formation and NMDAR2B recruitment to synapses

Figure 6 : VEGFR2 loss of function prevents the VEGF and NMDA-induced synapse formation

Figure 7 : Postsynaptic enrichment in NMDAR2B and PSD95 with co-activation of VEGF and NMDA receptors

Figure 8 : Induction of synaptic plasticity markers with co-activation of VEGF and NMDA receptors

Figure 9 : Ultrastructural changes of postsynaptic densities upon VEGF and NMDA receptor co-activation

## Résultats 2<sup>e</sup> partie : Rôle du VEGF dans les processus de plasticité *in vivo*

Figure 1 : Fear Conditioning

Figure 2 : Effects of VEGFR2 deletion on glutamatergic synaptic transmission

Figure 3 : Phototaxic behavior is dependant on NMDAR and PVR activity

## Discussion :

Modèle 1 : Maintien des récepteurs NMDA en surface par activation de VEGFR2

Modèle 2 : Exocytose des récepteurs NMDAR2B après induction de la PLC $\gamma$  par VEGFR2

Modèle 3 : Diffusion latérale des récepteurs NMDA

Modèle 4 : Régulation du recyclage des récepteurs NMDA par VEGFR2

Modèle global : Action du VEGF lors de la co-activation des récepteurs NMDA et VEGFR2

Figure 11 : Sites de libération du VEGF





## Rôle du VEGF dans la régulation de la synapse glutamatergique

---

Le vascular endothelial growth factor (VEGF) un facteur de croissance essentiel du système vasculaire exerce des fonctions multiples sur les cellules nerveuses en favorisant la neurogenèse, la plasticité synaptique ou encore l'apprentissage et la mémoire. Cependant, les mécanismes impliqués dans son action régulatrice de la transmission et la plasticité synaptiques restent à élucider. Nous avons récemment mis en évidence une nouvelle interaction entre VEGFR2, le récepteur principal du VEGF, et les récepteurs NMDA (NMDAR) au cours de la migration des neurones pendant le développement du cervelet. Comme les NMDAR sont des acteurs clés de la transmission et de la plasticité synaptique, nous avons exploré le rôle du VEGF dans la régulation de l'expression et de la fonction des NMDAR synaptiques dans l'hippocampe. Nos résultats révèlent que le VEGF et son récepteur sont exprimés dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe et le domaine extracellulaire de VEGFR2 peut se lier à la sous-unité GluN2B des NMDAR. Le VEGF est capable d'augmenter la transmission synaptique dépendant des NMDAR en régulant l'adressage synaptique des récepteurs exprimant la sous-unité GluN2B. Il se produit également une augmentation du nombre de synapses en présence du VEGF. Ces effets du VEGF requièrent la co-activation des récepteurs VEGFR2 et NMDAR et conduisent à un enrichissement synaptique en récepteurs glutamatergiques de type AMPA qui dépend de l'activation de la CaMKII. Nos travaux démontrent pour la première fois un rôle direct de la signalisation VEGF/VEGFR2 dans la fonction de la synapse excitatrice glutamatergique.

---

### VEGF modulates NMDAR synaptic function and localization in the hippocampus

---

The vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a critical role during vascular development but recent evidence indicates that it also regulates various neuronal processes in the nervous system, such as neurogenesis, hippocampal synaptic plasticity, learning and memory. Recently, we showed a novel interaction between the glutamate receptor NMDA (NMDAR) and the VEGF receptor VEGFR2 during neuronal migration in the developing cerebellum. As

NMDAR have been widely implicated in synaptic transmission and plasticity, we hypothesized that VEGF might regulate NMDAR function in hippocampal synaptic transmission and plasticity, as well as in learning and memory. Our results revealed that VEGF and its receptor VEGFR2 are expressed in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus. Biochemical exploration highlighted an interaction between the extracellular domain of VEGFR2 and the GluN2B subunit of NMDAR. In addition, whole-cell patch clamp experiments in acute hippocampal slices showed that VEGF potentiates post-synaptic GluN2B-expressing NMDAR responses. Furthermore NMDAR and VEGFR2 co-activation in hippocampal neurons increased the pool of synaptic GluN2B-NMDAR and affects synapse number. These processes are associated with an increase in AMPAR synaptic expression and an involvement of CaMKII signaling pathway. Altogether, our results demonstrated for the first time a direct effect of VEGF on the function of excitatory glutamatergic synapses.

---

Discipline : NEUROSCIENCES

---

Mots Clés / Keywords

« VEGF » « NMDAR » « plasticité synaptique »/ « synaptic plasticity » « hippocampus »  
« CaMKII »

---

INSERM U1028, CNRS UMR5292, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, Equipe Neuro-oncologie et Neuro-inflammation, Faculté Laënnec, Rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon Cedex 08, France.





# SOMMAIRE

## Partie I : Rôle du VEGF dans la régulation de l'activité synaptique des récepteurs

NMDA .....	21
INTRODUCTION .....	23
I. Mécanismes développementaux communs des systèmes nerveux et vasculaire .....	25
1. Similitudes anatomiques des deux systèmes.....	25
2. Signaux communs de guidage .....	28
II. Le VEGF et ses récepteurs .....	33
1. La famille des VEGF .....	33
a) Le VEGF-A ou VEGF .....	33
b) Les isoformes du VEGF.....	35
2. Récepteurs au VEGF .....	36
3. Corécepteurs au VEGF.....	42
4. Régulation de l'activité de VEGFR2 .....	44
a) Régulation de la dégradation de VEGFR2 et blocage du signal VEGF .....	44
b) Régulation de la transduction du signal induit par le VEGF.....	46
III. Le VEGF et système nerveux .....	49
1. Expression des récepteurs au VEGF dans le système nerveux .....	49
2. Rôles trophiques du VEGF .....	51
a) Rôle pro-survie du VEGF .....	51
b) Rôle du VEGF dans la croissance axonale .....	53
c) Rôle du VEGF dans la Prolifération.....	54
d) Rôle du VEGF dans la néo-neurogenèse (chez l'embryon) et neurogenèse (chez l'adulte) .....	55
3. Rôle du VEGF dans le guidage des neurones .....	56
4. Régulation de l'activité neuronale par le VEGF.....	58
5. Rôle du VEGF dans les processus mnésiques.....	60
IV. La synapse glutamatergique .....	63
1. Transmission synaptique : généralités .....	63
2. Un modèle d'étude : l'hippocampe .....	64

3.	La densité post-synaptique .....	67
a)	Les protéines d'échafaudage .....	67
b)	Protéines synaptiques associées au cytosquelette .....	71
c)	Interactions trans-synaptiques.....	72
V.	Les récepteurs du glutamate de type NMDA.....	75
1.	Les différentes sous-unités du NMDAR .....	75
a)	La sous-unité GluN1 .....	75
b)	Les sous-unités GluN2.....	77
2.	Expression spatiotemporelle des NMDARs.....	80
3.	Rôle des interactions protéiques dans la régulation des NMDARs .....	81
a)	Mise en place et maturation des synapses glutamatergiques .....	81
b)	Les protéines d'adhésion transmembranaires .....	82
c)	La matrice extracellulaire .....	83
d)	Les protéines post-synaptiques .....	84
e)	Contribution des NMDAR2B .....	85
VI.	Rôle des NMDAR dans la transmission et la plasticité synaptique .....	87
1.	NMDAR et transmission synaptique .....	87
2.	Régulation du trafic des NMDAR.....	88
a)	Export du réticulum et adressage à la membrane .....	88
b)	Internalisation et ancrage synaptique .....	89
c)	Diffusion latérale des NMDAR.....	91
VII.	Bases cellulaires et moléculaires de la mémoire : Les différents processus de plasticité dans l'hippocampe .....	93
1.	La potentialisation à long terme : la LTP .....	93
a)	Généralités.....	93
b)	Induction .....	94
c)	Expression et signalisation .....	96
d)	Marqueurs.....	99
e)	Modulateurs.....	101
2.	La dépression à long terme : la LTD .....	104
a)	Induction de la LTD .....	104
b)	Expression, signalisation et marqueurs .....	105
VIII.	Hypothèses de travail.....	107
	RESULTATS.....	109
	<b>Partie II : Implication du VEGF dans le comportement de la souris et de la drosophile .....</b>	<b>153</b>
	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>155</b>

RESULTATS.....	161
Protocoles.....	162
Implication du VEGF endogène dans la consolidation mnésique d'apprentissages associatifs chez la souris .....	164
Test de conditionnement à la peur chez des souris transgéniques conditionnelles pour VEGFR2 .....	165
Conditionnement à la peur ou conditioning .....	165
Test au contexte .....	166
Test au nouveau contexte .....	166
Perturbation de la transmission synaptique chez les souris adultes déficientes en VEGFR2	169
Rôle des voies PVF/PVR et glutamate/NMDAR dans des phénomènes de plasticité chez la drosophile.....	170
DISCUSSION .....	175
Rôle du VEGF dans l'augmentation de la transmission synaptique glutamatergique .....	178
Rôle de la voie VEGF/VEGFR2 dans la mise en place de nouvelles synapses.....	185
Rôle de la voie VEGF/VEGFR2 dans certaines formes de plasticité synaptique comme la LTP	186
Libération physiologique du VEGF à la synapse.....	191
Rôle de la voie VEGF/VEGFR2 dans l'apprentissage et la consolidation mnésique .....	192
Implication de la voie VEGF/VEGFR2 dans les pathologies de la mémoire.....	193
Perspectives.....	195
Conclusion .....	196
BIBLIOGRAPHIE.....	199

**Annexe 1 : VEGF modulates NMDA receptors activity in cerebellar granule cells through Src-family kinases before synapse formation**

**Annexe 2 : Disrupted surface cross-talk between NMDA and Ephrin-B2 receptors in anti-NMDA encephalitis**





**Partie I : Rôle du VEGF dans la régulation  
de l'activité synaptique des récepteurs  
NMDA**



# INTRODUCTION



## I. Mécanismes développementaux communs des systèmes nerveux et vasculaire

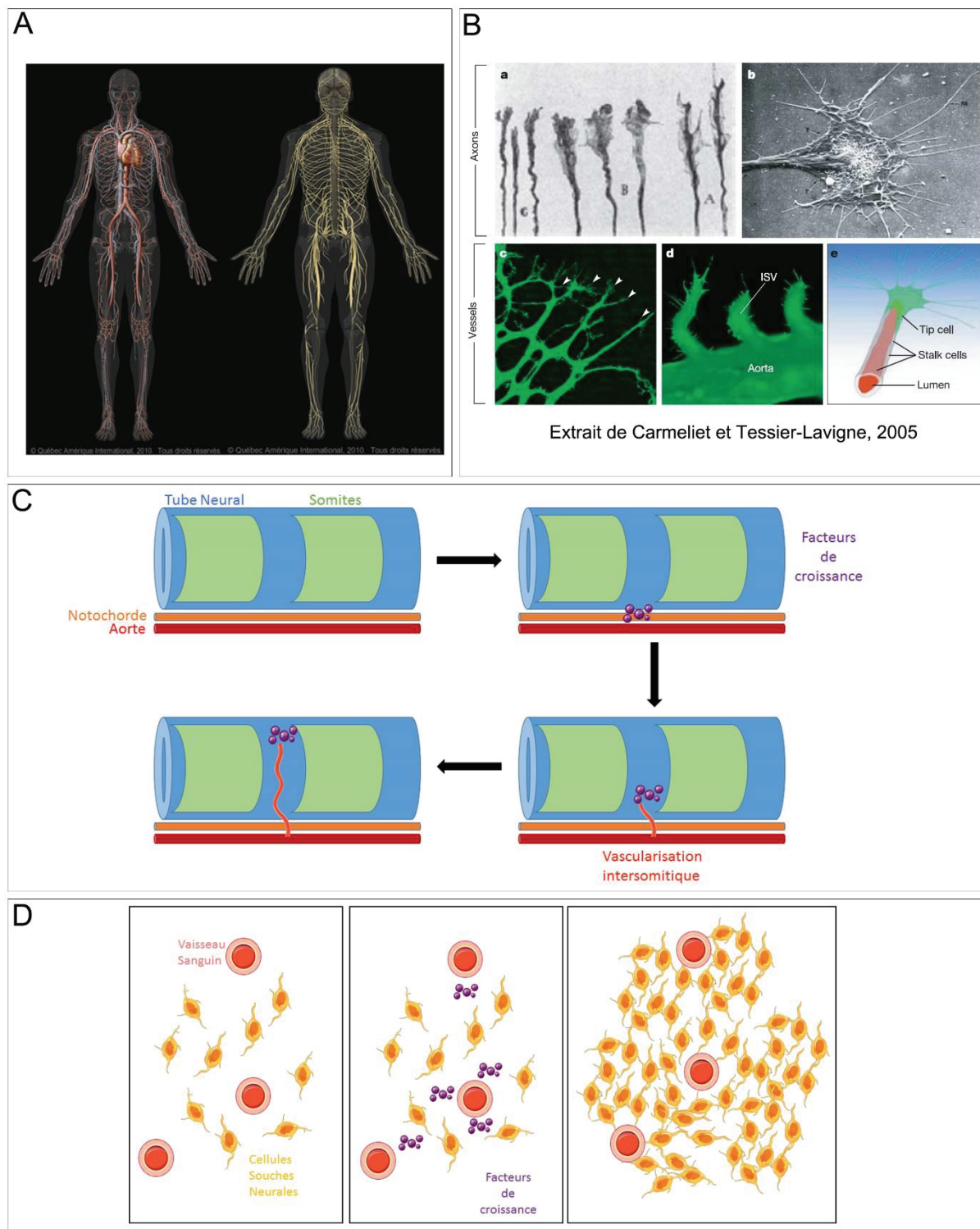
### 1. Similitudes anatomiques des deux systèmes

Au cours de l'évolution, la complexification des êtres vivants a conduit au développement de deux systèmes très spécialisés et complémentaires, le système nerveux et le système vasculaire, afin d'assurer le bon fonctionnement de l'organisme. Chez les organismes dotés d'un système nerveux primitifs, comme *C. elegans*, il n'existe pas de système vasculaire car l'hémolymphe diffuse librement dans le liquide interstitiel, dans un système circulatoire ouvert. Un réseau de trachées apparaît chez les insectes, mais le système vasculaire ne se développe véritablement que chez les vertébrés avec l'apparition de véritables réseaux de vaisseaux sanguins. Son rôle est principalement de subvenir au besoin en oxygène et nutriments des autres systèmes (nerveux, musculaire, digestif...). Chez l'homme, le système nerveux et le système vasculaire présentent une architecture comparable, très ramifiée dont les trajets semblent calqués l'un sur l'autre (Carmeliet and Tessier-Lavigne 2005) (Figure 1A). A l'échelle macroscopique, ces deux systèmes présentent une organisation en réseaux afférents et efférents (nerfs sensoriels – nerfs moteurs / réseau artériel – réseau veineux), et cheminent parallèlement l'un à l'autre. Ce haut degré de similitude dans l'organisation des deux systèmes suggère que des mécanismes développementaux communs sont mis en jeu avec une forte interaction entre chaque système lors de leur mise en place.

En 1986, Werner Risau identifiait un facteur de croissance libéré par le cerveau de l'embryon de poulet appelé Embryonic Brain-Derived Angiogenesis Factor (EBAF). Ce facteur avait la caractéristique de favoriser la prolifération des cellules endothéliales et la croissance des vaisseaux. Risau propose alors que ce facteur de croissance d'origine neurale permettrait la perfusion du tissu en favorisant la formation des vaisseaux (Risau 1986). Cette étude montrait pour la première fois une interaction biochimique entre le système nerveux et le système vasculaire pendant le développement. Chez l'embryon de souris, le tube neural formant l'ébauche de la moelle épinière recrute des précurseurs des cellules endothéliales qui sont impliquées dans la formation du plexus vasculaire primitif (Kirby, Gale et al. 1983) (Figure 1C). Cette stratégie de mise en place du plexus vasculaire primitif indique que des facteurs

angiogéniques peuvent être produits par le système nerveux embryonnaire et permettre le développement coordonné de ces deux systèmes. Cette interaction entre système nerveux et système vasculaire perdure à l'âge adulte car les cellules endothéliales des vaisseaux influencent la néo-neurogénèse dans les zones germinales de la zone sous-ventriculaire et de la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe. Dans ces deux régions les cellules souches neurales prolifèrent au sein de niches vasculaires, en apposition étroite avec les cellules endothéliales des capillaires sanguins (Carmeliet 2003; Wittko-Schneider, Schneider et al. 2013) (figure 1D).

A l'échelle cellulaire, les neurones et les cellules endothéliales utilisent des structures spécialisées qui ont une fonction analogue pour affiner leur trajectoire et former des réseaux appropriés. Il s'agit du cône de croissance des neurones et de cellules endothéliales spécialisées ou « tip cells », qui sont présentes à l'extrémité des vaisseaux sanguins au cours de l'angiogenèse (Gerhardt, Golding et al. 2003) (Figure 1B). Ces structures émettent de fins prolongements ou filopodes qui permettent d'analyser le microenvironnement et de capter les signaux attractifs ou répulsifs pour guider leur trajectoire (Gerhardt, Golding et al. 2003; Carmeliet and Tessier-Lavigne 2005). Ces signaux de guidage appartiennent à différentes familles de molécules identifiées initialement dans le système nerveux des invertébrés (*C. elegans*, *Drosophila* ou sauterelle), par des études génétiques *in vivo*, et confirmées ultérieurement chez les vertébrés (Dickson 2002). L'étude de l'organisation topographique des voies visuelles entre la rétine et le tectum du poulet a également permis d'identifier une autre classe de signaux de guidage membranaires. Ces différents signaux sont communs aux deux systèmes et appartiennent à la famille des Nétrines, Slits, Ephrines, Sémaforines et des VEGF (Carmeliet 2003; Carmeliet and Tessier-Lavigne 2005).



**Figure 1: Similitudes anatomiques, cellulaires et moléculaires des systèmes nerveux et vasculaire. A)** Comparaison de l'arbre vasculaire (gauche) et de l'innervation (droite) chez l'homme. **B)** Comparaison de l'aspect du cône de croissance (haut) et des "tip cells" (bas), extrait de Carmeliet et Tessier-Lavigne, 2005. Ces deux structures sont impliquées respectivement dans le guidage de l'axone et dans la formation des vaisseaux sanguins. **C)** Développement du plexus vasculaire primitif. Le tube neural émet des facteurs de croissance qui permettent le recrutement de cellules endothéliales et le développement du plexus vasculaire primitif. **D)** Rôle des facteurs de croissance vasculaire dans la neurogenèse. La libération de facteurs de croissance dans le milieu extracellulaire permet d'induire la prolifération des cellules souches neurales au sein des niches vasculaires.



## 2. Signaux communs de guidage

Ces quatre grandes familles de signaux présentées ci-dessus regroupent les principaux acteurs qui contribuent à guider les axones vers leur cible, mais ils participent également à l'orientation de la migration des cellules endothéliales et à l'établissement des réseaux vasculaires (Tam and Watts 2010; Chauvet, Burk et al. 2013) (Figure 2).

Les Nétrines sont des protéines secrétées dans la matrice qui appartiennent au groupe des laminines et, exercent une activité chimiotropique indispensable au guidage des axones et des neurones au cours du développement embryonnaire des vertébrés (Serafini, Kennedy et al. 1994). Trois formes secrétées ont été identifiées chez les mammifères qui peuvent se lier aux récepteurs transmembranaires de la famille DCC (deleted colorectal carcinoma) (DCC et Néogénine), ainsi qu'aux récepteurs UNC5 (Uncoordinated) et DSCAM (Lai Wing Sun, Correia et al. 2011). De plus, deux autres formes peuvent se lier à la membrane par un lien Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol et s'associent spécifiquement à des récepteurs transmembranaires de nature NGL (Netrin G Ligand) (Lai Wing Sun, Correia et al. 2011). La Nétrine, initialement identifiée comme un facteur de guidage attractif, s'est révélée bi-fonctionnelle selon les complexes de récepteurs associés et les voies intracellulaires mises en jeu par l'activation de protéines kinases spécifiques (Colamarino and Tessier-Lavigne 1995). D'autres fonctions de la Nétrine ont depuis lors été mises à jour dans la formation des branches d'axones, la morphogenèse de l'arborisation terminale des axones et la synaptogenèse (Manitt, Nikolakopoulou et al. 2009). Pendant l'angiogenèse, l'action de la Nétrine reste sujet à controverse car si des études évoquent un rôle pro-angiogénique (Wilson, Li et al. 2006), d'autres montrent que la Nétrine contribue à inhiber la motilité des filopodes des tip cells, à induire la rétraction des cellules endothéliales et à prévenir la formation de nouveaux vaisseaux via le récepteur UNC5B (Larrivee, Freitas et al. 2007).

Les ligands Slit1-3 présents chez les mammifères sont des protéines secrétées qui agissent comme des facteurs répulsifs pour les axones et les cellules en migration. Ils se lient aux récepteurs transmembranaires de la famille Robo (pour Roundabout), dont 4 membres ont été identifiés chez les mammifères (Robo1-4). Le récepteur Robo-4 est plus spécifiquement exprimé sur les cellules endothéliales. Le couple Slit/Robo module d'autres phénomènes que le guidage et favorise l'élongation et la bifurcation axonale. En particulier le fragment N terminal de Slit2 stimule ce type d'activité pour les neurones sensoriels des ganglions de la

racine dorsale (Wang, Brose et al. 1999). Slit et Robo sont également capables de promouvoir la croissance et le branchement des dendrites des neurones corticaux, régulant ainsi leur développement (Whitford, Marillat et al. 2002). Dans le système vasculaire, Slit et Robo exercent également une activité répulsive ou attractive sur la migration des cellules endothéliales selon le facteur et le récepteur impliqués (Autiero, De Smet et al. 2005).

Les Ephrines représentent une famille de neuf ligands liés à la membrane, qui se répartissent en deux groupes selon leur mode de liaison : les Ephrines-A sont ancrées par un groupement de type Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol et les Ephrines-B ont un domaine transmembranaire hydrophobe. Ces ligands s'associent à des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase (seize au total) de sorte que les récepteurs EphA lient préférentiellement les Ephrines-A et les EphB les Ephrines-B (Pasquale 2008). Cette liaison à la membrane des ligands/récepteurs met en jeu des interactions de contact entre deux cellules qui régulent des fonctions aussi variées que la migration cellulaire, le guidage axonal, l'établissement de cartes topographiques des connexions axonales, et la formation et la fonction des synapses (Hruska and Dalva 2012; Klein 2012). De plus, elle permet une signalisation bidirectionnelle des Ephrines non seulement directe dans la cellule qui exprime le récepteur mais aussi inverse dans la cellule qui exprime le ligand (Pasquale 2008). Dans le système vasculaire, les cellules endothéliales des artères et des veines expriment de manière exclusive certains ligands ou récepteurs, comme Ephrine-B2 et EphB4, qui sont à l'origine d'une ségrégation de ces deux types de vaisseaux chez le poisson zèbre (Herbert, Huisken et al. 2009).

Les Sémaforines regroupent vingt membres de structure variée, transmembranaires ou sécrétées, mais qui contiennent tous un domaine extracellulaire hautement conservé, le domaine « sema » (Kolodkin, Matthes et al. 1993). Chez les vertébrés, la première Sémaforine identifiée a été la Séma-3A/Collapsin-1 chez le poulet, comme une protéine capable d'induire le collapse des cônes de croissance (Luo, Raible et al. 1993). Les Sémaforines se lient à des récepteurs transmembranaires de type Plexine, ou au corécepteur Neuropiline pour celles de classe 3 (Sharma, Verhaagen et al. 2012), mais elles peuvent également s'associer à d'autres protéines transmembranaires comme les Intégrines, à des récepteurs du système immunitaire, ou à des protéines intégrées à la membrane tels que les Protéoglycanes (Zhou, Gunput et al. 2008). Ces protéines exercent en général une action répulsive sur les axones et les neurones au cours du développement et sont

indispensables à la mise en place de plusieurs réseaux de connexions (Messersmith, Leonardo et al. 1995; Schwarz, Vieira et al. 2008). Cependant, selon le corécepteur associé à la Plexine et/ou les voies intracellulaires mises en jeu, les Sémaphorines, comme les Ephrines, peuvent être bi-fonctionnelles (Zhou, Gunput et al. 2008). Certaines Sémaphorines de classe 3 telle que la Sema-3E exercent une action répulsive sur les cellules endothéliales des vaisseaux inter-somitiques chez l'embryon de poulet et de souris en se liant exclusivement à la PlexinD1, et contribuent à segmenter le réseau vasculaire en établissant des territoires frontières (Gu, Yoshida et al. 2005). La Sema-4A, un autre ligand de la PlexinD1 aurait également un rôle anti-angiogénique chez l'embryon de poulet, mais son impact ne serait pas essentiel à la mise en place du système vasculaire chez la souris (Toyofuku, Yabuki et al. 2007).

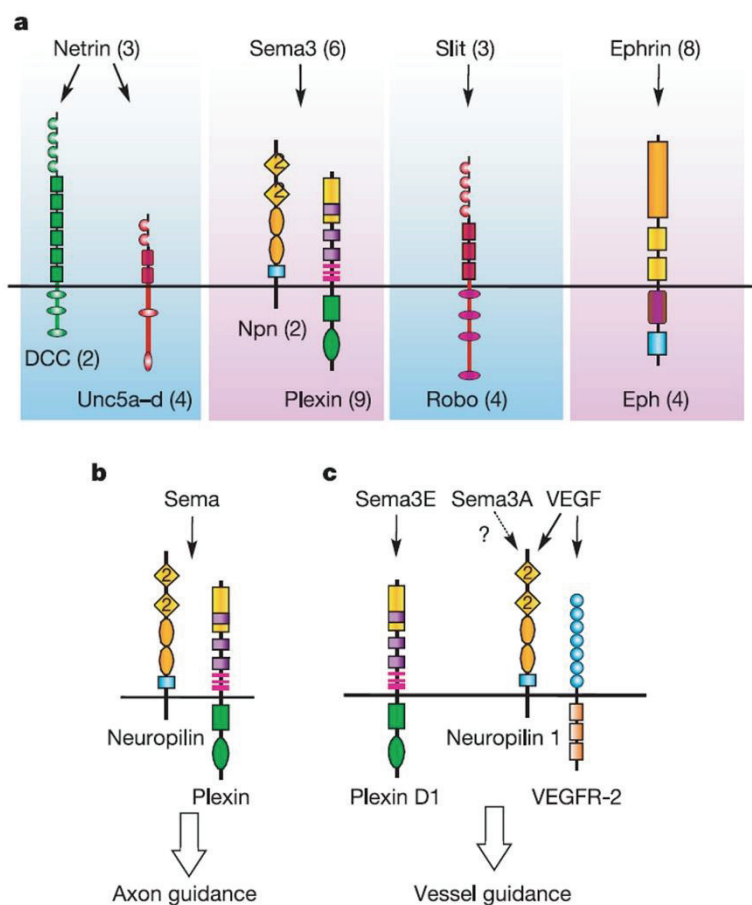
La famille des VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) consiste en des homodimères de glycoprotéines et comprend six membres homologues (VEGFA, B, C, D, E et PIGF) dont VEGFA (ou VEGF) est le membre fondateur. Il a été initialement isolé et considéré comme un facteur qui augmente la perméabilité vasculaire (Senger, Galli et al. 1983), puis purifié à partir d'un milieu conditionné de cellules hypophysaires et identifié comme un facteur mitogène capable d'induire l'angiogenèse *in vivo* (Ferrara and Henzel 1989; Leung, Cachianes et al. 1989). Depuis lors de nombreuses études ont montré qu'il stimule la prolifération des cellules endothéliales, leur migration et leur différenciation. L'expression embryonnaire du VEGF coïncide avec la mise en place du cœur embryonnaire et des premiers vaisseaux, et son expression reste maintenue à un niveau trois fois supérieur à celui de l'adulte dans les premiers jours après la naissance, qui correspond à la formation des capillaires (Jakeman, Armanini et al. 1993; Tomanek, Ratajska et al. 1999). Le VEGF permet donc de stimuler la croissance des cellules endothéliales (Breier, Albrecht et al. 1992). Son expression dans le cerveau embryonnaire est principalement localisée près des ventricules pendant les stades de prolifération intense des cellules endothéliales, puis diminue à l'âge adulte, lorsque leur prolifération est réduite (Breier, Albrecht et al. 1992). Le VEGF est également un facteur qui régule la fenestration des cellules endothéliales et la perméabilité des vaisseaux sanguins (Esser, Wolburg et al. 1998). L'importance du VEGF dans la régulation de la vasculogenèse - processus de formation embryonnaire des premiers vaisseaux sanguins - et de l'angiogenèse - processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants - est illustrée par l'invalidation d'un de ses allèles chez la souris, qui provoque une désorganisation du système

vasculaire et la mort de l'embryon à 9 jours (Carmeliet, Ferreira et al. 1996; Ferrara, Carver-Moore et al. 1996). L'action du VEGF est relayée principalement par deux récepteurs tyrosine kinase VEGFR1 et VEGFR2. VEGFR2 représente le récepteur principal impliqué dans les processus de vasculogénèse et d'angiogénèse (Millauer, Wizigmann-Voos et al. 1993; Flamme, Breier et al. 1995) alors que VEGFR1 module son activation ou la prévient en séquestrant le VEGF (Shibuya 2001). Une forte expression du récepteur VEGFR2 est observée pendant la vasculogénèse et l'angiogénèse, qu'elle soit physiologique, pendant le développement, ou pathologique, associée au développement tumoral. La délétion du VEGFR2 chez l'embryon de souris induit la mort des fœtus in utero au 9<sup>e</sup> jour (Shalaby, Rossant et al. 1995). Les récepteurs Neuropilines (Nrp1 et Nrp2) interviennent comme des co-récepteurs de VEGFR1 et VEGFR2 et ont la capacité de réguler leur signalisation (Neufeld, Kessler et al. 2002).

Les différents couples de ligands/récepteurs qui exercent une fonction de guidage peuvent interagir avec le VEGF et ses complexes de récepteurs afin d'affiner la régulation de ces signaux et permettre un développement optimal du système vasculaire. Ainsi le récepteur Robo4, exprimé spécifiquement par les cellules endothéliales, active le récepteur endothélial UNC5B et induit un blocage de la signalisation du VEGF et contribue à maintenir l'intégrité du réseau vasculaire en inhibant l'angiogénèse (Koch, Mathivet et al. 2011). Un deuxième exemple qui souligne l'importance de ces interactions est illustré par la capacité du ligand Ephrine B2 à réguler le guidage des cellules endothéliales de la rétine de souris, en facilitant l'internalisation du récepteur VEGFR2. Cette étape d'internalisation du récepteur favorise l'efficacité et /ou la durée d'activation des voies de signalisation en aval et permet de maintenir l'effet chimiotaxique du VEGF (Sawamiphak, Seidel et al. 2010). Ces études mettent en évidence la complexité de la régulation du guidage dans le système vasculaire, qui requiert une expression combinatoire de différents signaux, avec néanmoins un rôle central du VEGF et de ses récepteurs.

Au cours de ma thèse, j'ai exploré en particulier l'impact du VEGF sur la régulation de l'expression et de l'activité synaptique de récepteurs au glutamate. Cette thématique m'a conduit à m'intéresser à la littérature sur le VEGF que je synthétiserai ci-dessous en privilégiant l'ensemble des connaissances relatives au système nerveux.

Extrait de Carmeliet et Tessier-Lavigne, 2005



**Figure 2: Signaux communs de guidage des systèmes nerveux et vasculaire.** (Extrait de Carmeliet et Tessier-Lavigne, 2005)  
**A)** Différentes voies impliquées dans le développement des systèmes nerveux et vasculaire (Nétrine, Sémaphorine, Slit et Ephrines) ainsi que leurs récepteurs. **B)** Voie des Sémaphorines et leur liaison avec les Neuropilines ou les Plexines dans le guidage de l'axone. **C)** Voie des Sémaphorines dans le guidage des vaisseaux sanguins par l'activation de la PlexineD1. Rôle du VEGF dans ce processus par sa fixation sur la Neuropiline-1 ou sur son récepteur VEGFR2.

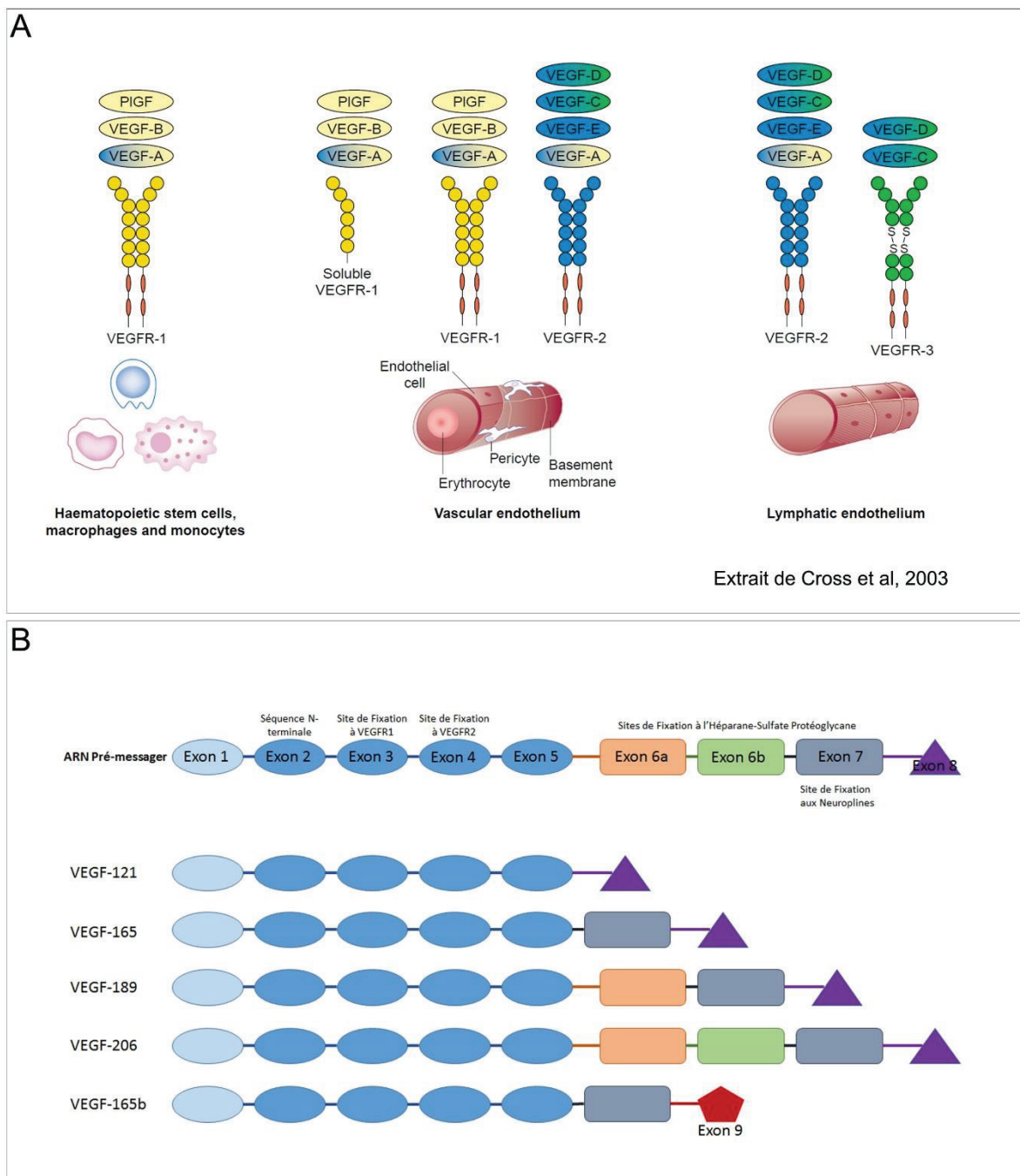
## II. Le VEGF et ses récepteurs

### 1. La famille des VEGF

Les VEGF appartiennent à la superfamille des facteurs de croissance de type VEGF-PDGF, avec une structure conservée de huit résidus cystéines qui favorise la formation de dimères par des ponts disulfures. Ces dimères constituent la forme biologiquement active des VEGF (Shibuya 2001; Holmes and Zachary 2005). Chaque membre de la famille des VEGF exerce une fonction biologique précise qui dépend en partie de son clivage par des protéases spécifiques, et des récepteurs mis en jeu (Koch, Tugues et al. 2011). Ces facteurs se lient à trois récepteurs tyrosine kinases VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3, de telle sorte que VEGFA, VEGFB et PIGF s'associent spécifiquement à VEGFR1, VEGFA se lie à VEGFR2, et les formes clivées matures de VEGFC et VEGFD activent VEGFR2 et VEGFR3 (Koch, Tugues et al. 2011) (Figure 3A). Un même VEGF peut donc activer différents types de récepteurs mais l'affinité du ligand pour son récepteur sera différente en fonction de la nature du récepteur impliqué. Ce sont des expériences d'inactivation réalisées chez la souris qui ont révélé ces fonctions en montrant par exemple que la liaison du VEGFA sur son récepteur VEGFR2 est essentielle au développement vasculaire alors que la signalisation de VEGFC via VEGFR3 gouverne la mise en place du système lymphatique (Jeltsch, Leppanen et al. 2013).

#### a) Le VEGF-A ou VEGF

Dans cette revue de la littérature, je me focaliserai sur le rôle du VEGF-A, ou VEGF, qui est un régulateur essentiel de la vasculogenèse et de l'angiogenèse physiologique et pathologique. Le VEGF est sécrété par les cellules du parenchyme de nombreux organes et agit localement selon un mode paracrine sur les cellules endothéliales. Son expression est influencée par des facteurs variés tels que des hormones (Shweiki, Itin et al. 1993), des régulateurs métaboliques (Arany, Foo et al. 2008), des facteurs de transcription en condition normoxique (Randi, Sperone et al. 2009) ou hypoxique. En situation d'hypoxie, le facteur de transcription HIF-1 (hypoxia Inducible factor 1) vient se fixer sur le motif HRE (Hypoxia Response Element) du promoteur du gène codant pour le VEGF et stimule ainsi la transcription du gène (Carmeliet 2003).



**Figure 3: Le VEGF et ses récepteurs.** A) Superfamille des VEGF et leur récepteurs respectifs (Extrait de Cross et al, 2003). Chaque VEGF active un récepteur spécifique impliqué dans différentes fonctions cellulaires. En dessous de chaque récepteur est illustré les principaux types cellulaires où il est exprimé (liste non exhaustive). B) Illustration des ARNm codant pour les isoformes principales de VEGF-A. Ces ARNm sont issus de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager. L'épissage détermine la capacité d'interaction avec la matrice extracellulaire de chaque isoforme codé par les exons 6 et 7.



Le gène du VEGF est localisé sur le chromosome 6 chez l'homme (6p21.3) comme chez la souris (6p21.1), avec une séquence codante d'environ 16kb (Brockington, Lewis et al. 2004). Ce gène est composé de 8 exons chez l'homme qui, après transcription en ARN pré-messager et épissage alternatif, est traduit en 6 isoformes dont 5 principales (comprenant 121, 145, 165, 189 et 206 acides aminés ; chez la souris les isoformes ont toutes un acide aminé de moins) (Holmes and Zachary 2005).

#### b) Les isoformes du VEGF

Les isoformes VEGF<sub>121</sub>, <sub>165</sub> et <sub>189</sub> sont les plus abondantes, VEGF<sub>165</sub> étant majoritaire, alors que les isoformes VEGF<sub>145</sub> et <sub>206</sub> sont exprimées plus rarement. L'ensemble de ces isoformes se distinguent par la présence ou l'absence des exons 6a, 6b et 7 qui codent pour des sites de liaison à l'héparane-sulfate protéoglycane, un composant important des protéines de la membrane plasmique et de la matrice extracellulaire (Neufeld, Cohen et al. 1999). La capacité de diffusion de chaque isoforme dans l'espace extracellulaire dépend de son affinité de liaison à la matrice extracellulaire. Ainsi, l'isoforme VEGF<sub>121</sub>, dépourvue de tout site de liaison, est une forme diffusible, alors que les isoformes VEGF<sub>165</sub> (exon 7), <sub>189</sub> (6a et 7), et <sub>206</sub> (exons 6a, 6b et 7) ont une affinité respectivement croissante pour la matrice extracellulaire, et des capacités de diffusion décroissantes (Cross, Dixelius et al. 2003) (Figure 3B).

Afin d'étudier le rôle spécifique de chaque isoforme de VEGF, trois lignées de souris ont été générées exprimant exclusivement VEGF<sub>120</sub> (VEGF<sup>120/120</sup>), VEGF<sub>164</sub> (VEGF<sup>164/164</sup>) ou VEGF<sub>188</sub> (VEGF<sup>188/188</sup>) (Carmeliet, Ng et al. 1999; Stalmans, Ng et al. 2002). Les souris VEGF<sub>120</sub> présentent des problèmes cardiorespiratoires causant la mort *in utero* de 50% des embryons, et une insuffisance cardiaque qui provoque la mort des nouveau-nés au plus tard deux semaines après leur naissance (Carmeliet, Ng et al. 1999). Les souris VEGF<sub>188</sub> sont quant à elles viables, même si ces souris présentent un taux de mortalité *in utero* significatif. Elles ont un poids et une taille inférieure à la normale et une diminution de la fertilité (Stalmans, Ng et al. 2002). L'expression exclusive de l'isoforme 188 empêche le développement normal de la vascularisation rétinienne alors que les souris VEGF<sub>164</sub> présentent en tout point un phénotype comparable aux souris sauvages (Stalmans, Ng et al. 2002). Ces études indiquent que chaque isoforme du VEGF joue un rôle spécifique. Le VEGF<sub>121</sub> régule la formation des vaisseaux



sanguins sur de longue distance, en contrôlant leur diamètre, alors que les formes plus longues (VEGF<sub>189</sub> et <sub>206</sub>) agissent sur de courtes distances et favorisent la formation de nouvelles branches (Carmeliet and Tessier-Lavigne 2005). La présence de ces différentes isoformes et leurs affinités différentes pour la matrice extracellulaire ne permettent pas d'évaluer les concentrations précises de VEGF dans les différents tissus. La combinaison de ces différentes isoformes forme un gradient spatial dans le microenvironnement qui est indispensable à l'élongation et au branchement du réseau vasculaire. Récemment, de nouvelles isoformes ont été identifiées ; elles sont produites par un épissage distal dans l'exon 7 et présentent 6 acides aminés additionnels dans la partie C terminale de la protéine (Bates, Cui et al. 2002). En particulier, l'isoforme VEGF<sub>165b</sub> a la particularité d'être sécrétée par les tissus sains et d'avoir une action antagoniste à celle du VEGF (prolifération, migration et vasodilatation). L'effet antagoniste de cette isoforme particulière du VEGF suggère un rôle anti-tumoral, d'autant plus que son expression est diminuée dans les tumeurs (Bates, Cui et al. 2002).

## 2. Récepteurs au VEGF

Les principaux récepteurs des VEGFs sont les récepteurs à activité tyrosine kinase VEGFR-1 (fms-related tyrosine kinase-1; Flt- 1), VEGFR-2 (fetal liver kinase 1; ou Flk-1 kinase insert domain-containing receptor ; KDR) et VEGFR-3 (fms-related tyrosine kinase-4; Flt-4), qui sont formés de sept domaines extracellulaires de type Immunoglobuline-like, d'un domaine transmembranaire, et d'un domaine intracellulaire tyrosine kinase hautement conservé, interrompu par un domaine d'insertion (Stuttfeld and Ballmer-Hofer 2009; Wittko-Schneider, Schneider et al. 2013). Seuls les 2<sup>ème</sup> et notamment le 3<sup>ème</sup> domaine d'Ig-like sont nécessaires à la liaison du VEGF à son récepteur, alors que les domaines 4 à 7 participent à la formation des dimères de récepteurs. Cette liaison ligand/récepteur provoque la dimérisation des VEGFR, qui peut être stabilisée par une association avec des corécepteurs ou d'autres molécules présentes à la surface des cellules comme les Héparanes Sulfate Protéoglycanes (HSPG). L'activation des VEGFR par leur ligand conduit à une trans-phosphorylation des résidus tyrosyles du domaine intracellulaire d'un des récepteurs par l'autre récepteur du dimère. Cette activation entraîne le recrutement de protéines kinases spécifiques via leur domaine SH2 et l'activation des voies de signalisation en aval (Cross, Dixelius et al. 2003) (Figure 4A).

Comme nous l'avons vu précédemment, les VEGFs ont des affinités différentes pour chacun des récepteurs mais la perte d'expression d'un seul des trois récepteurs à activité tyrosine kinase VEGFR est létale pour les embryons de souris entre 8 et 9 jours (Fong, Rossant et al. 1995; Shalaby, Rossant et al. 1995; Dumont, Jussila et al. 1998). L'absence de VEGFR1 se traduit par la présence d'îlots vasculaires désorganisés et de vaisseaux sanguins très larges, obstrués par des cellules endothéliales qui proviennent d'un pool de précurseurs exubérant (Fong, Rossant et al. 1995; Fong, Klingensmith et al. 1996). Le phénotype observé après une invalidation de VEGFR2 est différent puisque le développement des cellules endothéliales est perturbé et aucun vaisseau sanguin ne se développe chez ces embryons (Shalaby, Rossant et al. 1995). Enfin, les souris déficientes en VEGFR3 présentent une altération de la maturation du réseau vasculaire, avec de gros vaisseaux désorganisés et une accumulation de fluide dans le péricarde, qui conduit à la mort des embryons entre le 9<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire (Dumont, Jussila et al. 1998). Chacun de ces récepteurs est donc indispensable au bon déroulement de la vasculogénèse au cours du développement embryonnaire.

VEGFR1 (fms-related tyrosine kinase-1; Flt- 1) fut le premier VEGFR identifié et découvert dans le placenta humain. Il est exprimé par les cellules endothéliales et d'autres types cellulaires, comme les cellules souches et les macrophages (Cross, Dixelius et al. 2003). Son rôle principal est d'exercer une régulation négative sur la mise en place des vaisseaux. Ce contrôle négatif est facilité par sa forte affinité pour le VEGF (10 fois supérieure à celle de VEGFR2) couplé à une faible capacité d'activation. Ces caractéristiques permettent au VEGFR1 de capter le VEGF en limitant sa liaison aux autres récepteurs (Cross, Dixelius et al. 2003). Ainsi, l'absence de la partie intracellulaire tyrosine kinase de ce récepteur n'empêche pas le développement des souris génétiquement modifiées et leur angiogénèse normale (Hiratsuka S et al. 1998). Le VEGFR1 est produit sous deux formes différentes, une forme transmembranaire complète et une forme courte soluble, sVEGFR1, composée de la partie extracellulaire et de 31 acides aminés supplémentaires dans sa partie C-terminale, issus d'une séquence intronique. Cette forme soluble est particulièrement active pendant la grossesse où elle régule les taux de VEGF et assure ainsi une perfusion normale du placenta. VEGFR1 pourrait également exercer une régulation positive via son activité tyrosine kinase, en particulier lors de la migration des monocytes périphériques induite par le VEGF (Shibuya 2001). Contrairement aux autres récepteurs de la famille Fms, VEGFR1 ne possède pas le motif conservé tyrosine-X-X-

méthionine impliqué dans l'activation de la voie PI3K, et son autophosphorylation permet principalement l'activation de la voie PLC $\gamma$ /PKC.

VEGFR2 (Fetal Liver Kinase-1, Flk1 ou Kinase Insert Domain Receptor, KDR) est exprimé par les cellules endothéliales des systèmes vasculaire et lymphatique, par les cellules musculaires lisses et les cellules souches hématopoïétiques. Contrairement à la situation précédemment décrite pour VEGFR1, VEGFR2 est considéré comme le principal médiateur de la réponse des cellules endothéliales au VEGF, car il régule leur prolifération, leur différenciation, leur survie et leur migration, et s'avère indispensable à la formation des vaisseaux sanguins. L'expression du récepteur à la membrane est augmentée par les conditions d'hypoxie. Plus précisément, l'hypoxie, via la production de monoxyde d'azote (NO), favorise la libération de VEGF par les cellules en souffrance (via la voie HIF/HRE décrite précédemment). L'augmentation de VEGF promeut l'expression de son récepteur VEGFR2 à la membrane, ce qui n'est pas le cas pour VEGFR1 ou VEGFR3. Il joue également un rôle clé chez l'adulte en régulant la perméabilité vasculaire (Wittko-Schneider, Schneider et al. 2013). La multiplicité des effets du VEGF résulte donc de l'activation de voies de signalisation spécifiques en aval de VEGFR2, qui mettent en jeu plusieurs sites de phosphorylation dans la partie intracellulaire du récepteur. On distingue en particulier 5 résidus tyrosyls, dont Y951, dans le domaine d'insertion, Y1054 et Y1059 dans le domaine kinase ainsi que Y1175 et Y1214 dans la partie C-terminale. La phosphorylation de deux de ces sites en particulier induit l'activation de la majorité des voies de signalisation intracellulaire Src, PLC $\gamma$ , IP3, MAPK/ERK, PKC, PI3K, Akt (Figure 4B). Il s'agit de Y951 et de Y1175. Une fois phosphorylée, la tyrosine 951 permet le recrutement et l'activation des Src kinases, par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice TAd (T-Cell SH2-containing Adaptor Protein), qui interagit avec le récepteur VEGFR2 via son domain SH2 (Src-Homology 2 domain) (Cross, Dixelius et al. 2003; Olsson, Dimberg et al. 2006). L'activation des Src kinases permet de réguler la réorganisation du cytosquelette d'actine des cellules endothéliales qui migrent en réponse au VEGF, mais n'est pas impliquée dans les cellules en prolifération (Matsumoto, Bohman et al. 2005).

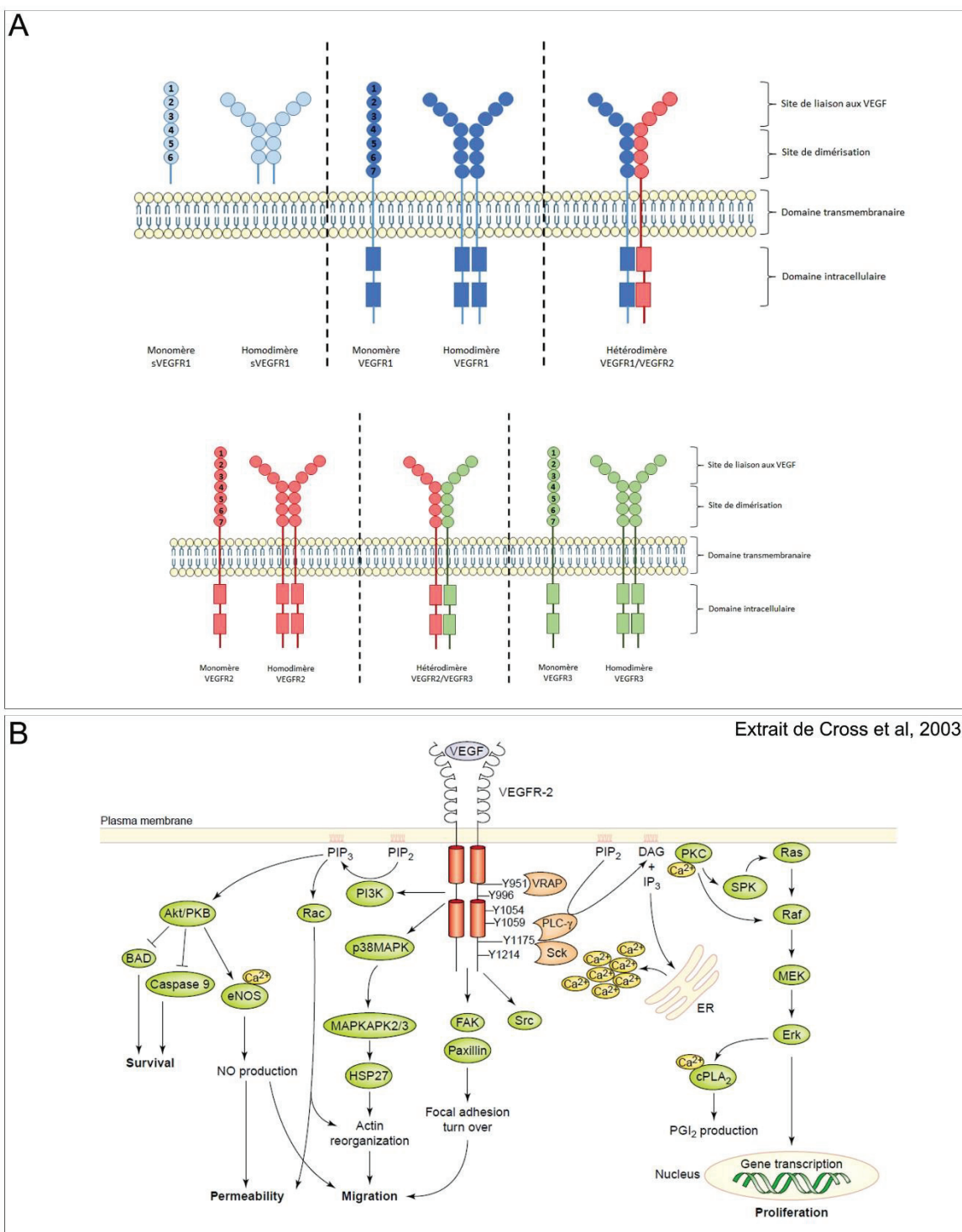
L'utilisation d'un modèle de souris génétiquement modifiée a révélé que la phosphorylation de la tyrosine 1175 de VEGFR2 en réponse au VEGF est essentielle. La substitution de ce résidu tyrosyl est létale chez la souris car le pool des précurseurs hématopoïétiques reste réduit et les vaisseaux sanguins ne se développent pas (Sakurai, Ohgimoto et al. 2005). Cette

phosphorylation permet d'initier l'activation de deux voies de signalisation importantes: la voie PI3K et la voie PLC $\gamma$ . La PLC $\gamma$  dégrade le PIP2 (phosphatidyl-Inositol-4,5-biPhosphate) en DAG (DiacylGlycérol) et IP3 (Inositol Triphosphate), qui active ses propres récepteurs (IP3R) et entraîne la libération de calcium dans le cytoplasme à partir du réticulum endoplasmique. L'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire initie ensuite directement la cascade d'activation des Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular-Signal-Regulated Kinase (MAPK/ERK1/2) ou indirectement via le DAG qui est un activateur de la Protéine Kinase C (PKC). Dans ces deux cas, la prolifération des cellules endothéliales est stimulée (Cross, Dixelius et al. 2003). L'autre voie activée par la phosphorylation de la tyrosine 1175 met en jeu la Phosphatidyl-Inositol-3-Linase (PI3K) qui induit la production de PIP3 (Phosphatidyl-Inositol-3.4.5-Triphosphate), puis le recrutement et l'activation de la Sérine-Thréonine Kinase AKT/PKB. Cette voie de signalisation joue un rôle prépondérant dans la survie des cellules endothéliales (Gerber, McMurtrey et al. 1998). La PI3K peut également activer la Nitric Oxide Synthase (eNOS) qui régule, via la production de NO, les processus de perméabilité vasculaire et de migration cellulaire en réponse au VEGF. Une voie alternative joue un rôle similaire en impliquant cette fois la cascade de signalisation PI3K/Small GTP-Binding Protein Rac (Eriksson, Cao et al. 2003). Enfin, la voie FAK/Paxillin peut être stimulée en aval de VEGFR2 et donner lieu à un remodelage des zones d'adhérence focale et à une régulation de la migration cellulaire (Rousseau, Houle et al. 1997; Qi and Claesson-Welsh 2001). Le VEGFR2, par l'activation de ses différents partenaires intracellulaires joue un rôle central dans la vasculogénèse et l'angiogénèse, en orchestrant l'équilibre entre survie et mort des cellules endothéliales, et en modulant leur prolifération et leur migration, et en favorisant le processus de perméabilité vasculaire.

VEGFR3, (Fms-Like Tyrosine Kinase 4, Flt4), comme nous l'avons indiqué auparavant, lie exclusivement le VEGFC et le VEGFD, mais n'interagit pas avec le VEGF. Ce récepteur est initialement exprimé par les cellules endothéliales du système vasculaire puis son expression se limite aux cellules endothéliales lymphatiques à des stades plus tardifs. Il joue donc un rôle important dans la mise en place du réseau vasculaire, comme en témoignent les anomalies vasculaires des souris déficientes en VEGFR3, puis son action physiologique se limite à la lymphangiogénèse (Jeltsch, Kaipainen et al. 1997; Paavonen, Puolakkainen et al. 2000; Mimura, Amano et al. 2001). Deux scénarios peuvent expliquer le phénotype embryonnaire

létal de ces souris génétiquement modifiées. D'une part, la perte de fonction de VEGFR3 peut minimiser des voies de signalisation clés qui sont normalement activées directement par la liaison du VEGFC ou VEGFD sur ce récepteur. D'autre part, l'absence de VEGFR3 peut provoquer en retour une stimulation excessive du VEGFR2 par les ligands VEGFC et VEGFD. Une invalidation ciblée de VEGFR3 directement dans les cellules endothéliales a révélé que ce récepteur peut avoir à la fois une action sur la croissance et la différenciation des cellules endothéliales pendant l'angiogenèse (Tammela, Zarkada et al. 2011). Les voies de signalisation activées par VEGF3 concernent, comme précédemment décrit pour VEGFR2, les MAPK/ERK1/2, la voie PLC $\gamma$ /PKC et la voie PI3K /AKT, et sont impliquées dans le contrôle de la prolifération, la survie et la migration des cellules endothéliales lymphatiques (Cross, Dixelius et al. 2003).

Plus récemment, il a été mis en évidence que les différents récepteurs au VEGF peuvent former des hétérodimères, soit VEGFR1/R2 soit VEGFR2/R3. La formation de ces complexes hétérodimériques permet une activation différentielle des voies de signalisation sous-jacente (Mac Gabhann and Popel 2007). En effet, la coopération entre VEGFR1 et VEGFR2 favorise la phosphorylation de VEGFR2 et augmente son activité angiogénique (Autiero, Waltenberger et al. 2003). Ces hétérodimères permettent également une activation plus importante de la PI3K, ce qui augmente les capacités de migration des cellules (Huang, Andersson et al. 2001). De la même manière, l'interaction entre VEGFR2 et VEGFR3 permet une activation différentielle de VEGFR3 par la régulation de la phosphorylation de son extrémité C-terminale (Dixelius, Makinen et al. 2003). Ces complexes sont impliqués dans la synthèse de molécules de signalisation importantes dans le système vasculaire, telle que la Prostacycline (Neagoe, Lemieux et al. 2005).



**Figure 4: Structures des récepteurs au VEGF et voies de signalisation activées par VEGFR2. A)** Organisation structurale des récepteurs au VEGF. La partie extracellulaire est composée de domaines Ig-Like. Les trois premiers domaines sont impliqués dans la liaison avec le VEGF, les 3 ou 4 derniers permettent la dimérisation des récepteurs. Seul le récepteurs sVEGFR1 n'exprime pas de domaine transmembranaire. La partie intracellulaire des récepteurs permet d'induire les voies de signalisation intracellulaires. **B)** Voies de signalisation activées par VEGFR2. Cinq sites de phosphorylation principaux (Y951, Y1054-1059, Y1175 et Y1214) permettent l'activation de nombreuses voies de signalisation telles que PI3K, PLC, Src, p38MAPK.

### 3. Corécepteurs au VEGF

Les VEGFs peuvent également se fixer sur d'autres récepteurs, ou corécepteurs, tels que les Neuropilines, caractérisés initialement comme les récepteurs des Sémaphorines de classe 3 dans le guidage axonal. Les Neuropilines (Nrp-1 et Nrp-2) sont des glycoprotéines transmembranaires qui s'expriment de manière différentielle dans les artères ou les veines (Nrp-1) ou dans les vaisseaux lymphatiques (Nrp-2) (Yuan, Moyon et al. 2002; Chauvet, Burk et al. 2013). Ces deux récepteurs ont une structure comparable, avec une grande région extracellulaire combinée à une partie intracellulaire réduite et dépourvue d'activité enzymatique. Leurs domaines extracellulaires incluent successivement 5 domaines de la partie N terminale à la région transmembranaire : les domaines a1/a2 ou domaine CUB (homologues aux facteurs du complément), les domaines b1/b2 (homologues aux domaines C1/C2 des facteurs de coagulation V et VIII) qui présentent une forte affinité de liaison au VEGF (Pellet-Many, Frankel et al. 2008) et le domaine C ou MAM (pour Meprin, A5, PTP  $\mu$ ), qui est nécessaire à la formation d'homo ou d'hétérodimères du récepteur. Les NRP-1 et NRP-2 lient spécifiquement certains VEGFs, de telle sorte que Nrp-1 interagit avec VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGFB et PIGF alors que Nrp-2 lie VEGF<sub>165</sub>, VEGFC et PIGF (Wild, Staton et al. 2012). Ce sont des études *in vivo* avec des souris génétiquement modifiées, caractérisées par la perte ou le gain de fonction du récepteur Nrp-1, qui ont révélées son implication dans la mise en place des réseaux vasculaires (Kawasaki, Kitsukawa et al. 1999; Jones, Yuan et al. 2008). En effet, Nrp-1 a la capacité de lier VEGF<sub>165</sub> et favorise la liaison de ce ligand à VEGFR2, ce qui contribue à amplifier l'activation du récepteur VEGFR2 et la réponse fonctionnelle en aval (Soker, Takashima et al. 1998; Geretti, Shimizu et al. 2008). Ainsi, le complexe VEGF/Nrp-1/VEGFR2 stimule la migration orientée des cellules endothéliales *in vitro* (Soker, Takashima et al. 1998), et favorise *in vivo* la fonction des « tip cells » indispensables à la formation des nouveaux vaisseaux pendant l'angiogenèse (Fantin, Vieira et al. 2013).

Comme énoncé précédemment, les Ephrines sont également connues pour intervenir dans le développement cardiovasculaire (Adams, Wilkinson et al. 1999). Comme pour les Neuropilines, un rôle important des complexes Ephrine-B/EphB a été montré dans la régulation de l'activité des récepteurs au VEGF. Ephrine-B2, via son domaine PDZ, permet la régulation de la localisation de VEGFR2 au niveau des tip cells, favorisant l'extension des filopodes et la migration des cellules. L'expression d'une forme tronquée du domaine PDZ de



Ephrine-B2 induit des problèmes d'angiogénèse (Makinen, Adams et al. 2005; Sawamiphak, Seidel et al. 2010). L'un des récepteurs à l'Ephrine-B2 impliqué dans l'angiogénèse est EphB4. Or, récemment, l'utilisation d'un bloqueur spécifique de EphB4, le NVP-BHG712, a provoqué une perturbation de l'angiogénèse induite par le VEGF, suggérant une interaction entre VEGFR et Eph pendant la formation des vaisseaux (Martiny-Baron, Holzer et al. 2010). L'Ephrine-B2 est également impliqué dans la lymphangiogénèse en régulant de l'activité de VEGFR3 et de sa réponse au VEGF-C (Wang, Nakayama et al. 2010). Enfin, la signalisation Ephrine-B2/EphB est impliquée dans la régulation de l'activation de la voie Ras/MAPK induite par VEGFR2, voie de signalisation impliquée dans la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Kim, Ryu et al. 2002). L'ensemble de ces études démontrent que la dynamique des filopodes des tip cells induite par le VEGF via ses récepteurs VEGFR2/VEGFR3 est finement contrôlée par l'activation de la signalisation Ephrine/Eph (Chauvet, Burk et al. 2013).

Les Intégrines sont des récepteurs transmembranaires dont les ligands sont dans la matrice extracellulaire. Ces récepteurs sont impliqués dans la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF via le récepteur Alpha5Beta3 (Senger, Ledbetter et al. 1996). Alpha5Beta3 favorise l'activation de VEGFR2, par phosphorylation, en réponse à une stimulation au VEGF (Soldi, Mitola et al. 1999; Rapraeger, Ell et al. 2013). Fascicline-1 permet d'inhiber l'effet de l'Intégrine Alpha5Beta3 en bloquant son interaction avec VEGFR2, inhibant également l'effet du VEGF sur la prolifération et migration des cellules endothéliales (Nam, Son et al. 2012). Les Intégrines sont également impliquées dans l'angiogénèse induite par le VEGF, comme c'est le cas pour Alpha1Beta1 ou Alpha2Beta1. Les antagonistes de ces deux récepteurs permettent de bloquer l'angiogénèse, révélant de possibles pistes dans le traitement des cancers (Senger, Claffey et al. 1997). Les intégrines sont donc connues pour réguler la réponse au VEGF, notamment via des mécanismes impliquant VEGFR2 (Byzova, Goldman et al. 2000). Les formes de VEGF ayant un site de fixation à l'héparane sulfate, en particulier l'isoforme 165 et l'isoforme 189, peuvent se fixer directement aux Intégrines, en particulier sur l'isoforme Alpha5Beta3. Ce n'est pas le cas des isoformes dépourvues de site héparane, comme l'isoforme 121 (Hutchings, Ortega et al. 2003). Plus étonnant, le récepteur sVEGFR1, forme soluble et sécrétée du récepteur, est également un ligand de l'intégrine Alpha5Beta1, et favorise la migration des cellules endothéliales. Ce nouveau rôle de sVEGFR1 confirme le rôle des Intégrines dans l'angiogénèse, mais montre surtout l'imbrication des deux systèmes,



VEGFR et Intégrines, dans la mise en place des vaisseaux (Orecchia, Lacal et al. 2003; Soro, Orecchia et al. 2008).

Comme d'autres facteurs de croissance, le VEGF requiert la présence des Héparane-Sulfate Protéoglycanes (HSPG) comme co-récepteurs, pour permettre une signalisation efficace (Jakobsson, Kreuger et al. 2006). En effet, l'absence de N-déacétylase/N-sulfotransférase (NDST) 1 et 2 – enzymes catalysant la biosynthèse d'Héparane Sulfate – chez les embryons de souris perturbe l'angiogenèse. NDST1 et 2 favorisent la formation des complexes VEGF/VEGFR2 et la signalisation qui en résulte (Jakobsson, Kreuger et al. 2006). Plus récemment, il a été démontré que l'Héparane Sulfate permet la régulation de multiples facteurs de croissance impliqués dans l'angiogenèse, et son absence altère l'angiogenèse (Le Jan, Hayashi et al. 2012). Cette interaction entre HSPG et VEGF-A permet de réguler l'induction de l'angiogenèse induite par le couple VEGF/VEGFR2. L'utilisation d'un ligand spécifique des HSPG permet de bloquer l'induction de l'angiogenèse en inhibant leur interaction avec VEGFR2 (Chiodelli, Mitola et al. 2011).

#### 4. Régulation de l'activité de VEGFR2

Comme d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase, l'internalisation de VEGFR2 est une étape cruciale dans le contrôle l'ampleur, la durée et le type de réponse induite. Dans le cas de VEGFR2, de nombreux partenaires participent à la régulation de son trafic et à l'induction des voies de signalisation sous-jacentes. Je vais vous présenter dans cette partie, deux aspects de la régulation du récepteur : a) la régulation de la dégradation du récepteur et le blocage du signal ; b) la régulation de l'induction des voies de signalisation suite à l'activation du récepteur par le VEGF.

##### a) Régulation de la dégradation de VEGFR2 et blocage du signal VEGF

Il est maintenant bien établi que VEGFR2 interagit avec les VE-Cadhérines, protéines d'adhésion cellulaire permettant le maintien de la structure des vaisseaux. Suite à l'activation de VEGFR2 par le VEGF, le récepteur s'autophosphoryle puis les VE-Cadhérines sont phosphorylées sur leurs résidus tyrosines. L'interaction avec les VE-Cadhérines bloque

l'internalisation de VEGFR2, et inhibe l'activation des voies sous-jacentes, notamment celles impliquées dans la prolifération cellulaire (Lampugnani, Orsenigo et al. 2006). La phosphorylation des VE-Cadhérine contrôle également les processus de perméabilité vasculaire via la perte de contact cellule-cellule (Esser, Lampugnani et al. 1998). L'inactivation des VE-Cadhérines induit la mort in-utero des fœtus, montrant ainsi leur rôle dans les voies de survie cellulaire induite par VEGF (Carmeliet, Lampugnani et al. 1999).

L'internalisation du VEGFR2 est finement régulée en particulier lors de la migration des cellules endothéliales qui participent à la formation des vaisseaux. Ces cellules sont fortement polarisées, et présentent une transduction efficace du signal VEGF qui favorise leur migration. Cette migration dépend des GTPases Rab. En effet, Rab5a facilite la fusion des vésicules d'internalisation de VEGFR2 avec les endosomes précoces, et permet une induction efficace des voies de signalisation. En revanche, Rab7a initie la fusion des vésicules d'internalisation de VEGFR2 avec les endosomes tardifs, et conduit VEGFR2 vers les voies de dégradations, bloquant ainsi sa signalisation (Jopling, Odell et al. 2009). Enfin, la matrice extracellulaire permet également de réguler l'activité de VEGFR2 et d'inhiber sa signalisation. TCPTP (T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase), aussi appelée PTN2 est une phosphatase activée par les intégrines, qui permet d'inactiver VEGFR2 par déphosphorylation (Mattila, Auvinen et al. 2008).

Les personnes souffrant d'hypercholestérolémie ont souvent des ischémies vasculaires associées. Les traitements au VEGF ne permettent pas de contrecarrer ces effets malgré son rôle joué dans l'induction de l'angiogenèse. Les cellules endothéliales en présence de taux élevés en LDL présentent une diminution de l'expression en surface de VEGFR1 et VEGFR2. L'exposition au LDL induit l'internalisation de VEGFR2 via la voie syntaxine-16, conduisant VEGFR2 vers les voies de dégradation. La réduction de l'expression membranaire de VEGFR2 induit une diminution de la capacité de réponse des cellules endothéliales au VEGF, expliquant pourquoi le traitement au VEGF ne donne pas de résultat satisfaisant (Jin, Hagemann et al. 2013).

### b) Régulation de la transduction du signal induit par le VEGF

Les études menées sur la transduction du signal VEGFR2 ont révélé une activation de la signalisation en deux temps: une première phase implique l'activation de kinases juxta-membranaires et se déroule au cours des cinq premières minutes suivant l'activation de VEGFR2 ; la deuxième phase qui permet l'induction de voies de signalisation intracellulaires plus profondes suite à l'internalisation du récepteur. Cette internalisation dépend de la Clathrine et permet une activation optimale et prolongée des voies de signalisation en aval (Lampugnani, Orsenigo et al. 2006; Chauvet, Burk et al. 2013).

Comme nous l'avons vu précédemment, VEGFR2 s'autophosphoryle après liaison du VEGF sur plusieurs résidus tyrosines situés dans la partie C-terminale intracellulaire. Ces phosphorylations sont nécessaires à l'activation des voies de signalisation sous-jacentes, comme la voie PLC $\gamma$  et à l'internalisation du récepteur. En effet, la mutation de ces sites de phosphorylation de VEGFR2 bloque l'internalisation du récepteur et perturbe l'activation des voies de signalisation (Dougher and Terman 1999). Ainsi, l'invalidation de la TXNIP (Thioredoxin-Interacting Protein), une protéine qui joue un rôle important dans la survie des cellules endothéliales, diminue la phosphorylation de VEGFR2 et l'activation à long terme des voies de signalisation PLC et Akt. Cette mutation perturbe également l'internalisation de VEGFR2 (Park, Shi et al. 2013). Ceci suggère donc que l'internalisation de VEGFR2 est nécessaire à l'activation à long terme des voies de signalisation intracellulaires. Les GTPase Rab sont connues pour réguler le trafic de la signalisation du récepteur VEGFR2 dans les cellules endothéliales (Jopling, Odell et al. 2009) et Rab5a en particulier oriente VEGFR2 vers les endosomes précoces après son internalisation. Lorsque cette protéine est invalidée, le trafic de VEGFR2 vers les endosomes précoces est bloqué et l'activation des voies de signalisation en aval est perturbée (Jopling, Odell et al. 2009; Park, Shi et al. 2013). On peut noter que TXNIP permet l'association de Rab5a avec VEGFR2, ce qui favorise une signalisation intracellulaire efficace (Park, Shi et al. 2013). L'internalisation du récepteur VEGFR2 semble donc essentielle à l'activation des cascades de signalisation sous-jacentes. Néanmoins, elle n'est pas indispensable à l'activation de certains partenaires de VEGFR2. En effet, les partenaires juxta-membranaires, comme C-Raf, sont activés normalement par VEGFR2 même en présence d'inhibiteur de l'endocytose. En revanche, l'utilisation de ces bloqueurs abroge

l'activation de ERK1/2. L'internalisation de VEGFR2 est donc nécessaire à l'activation de kinases localisées plus profondément dans le cytoplasme (Gourlaouen, Welti et al. 2013).

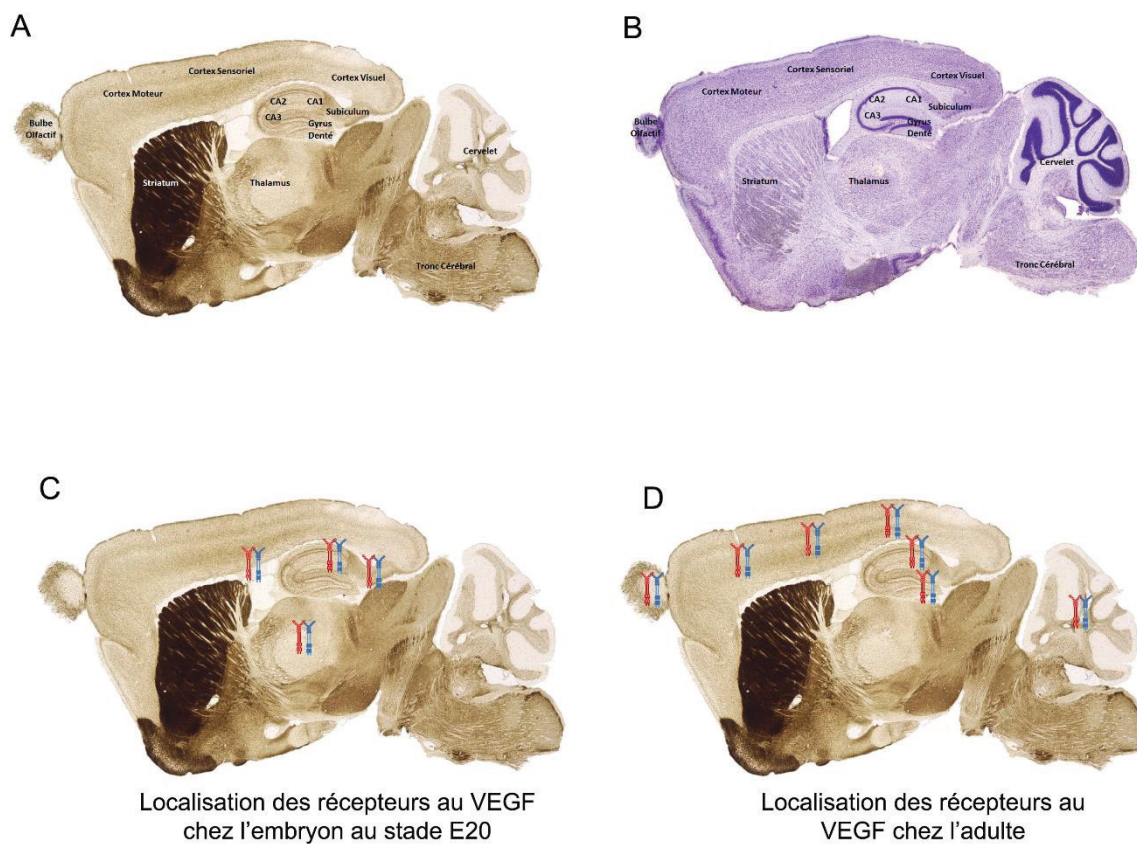
Le contrôle de l'internalisation de VEGFR2 joue donc un rôle clef dans la réponse cellulaire au VEGF. VEGFR2 est localisé à la membrane plasmique dans les cavéoles ou appelé raft lipidique qui sont des régions enrichies en Cavéoline-1, Rac1 et ARF6 (Ikeda, Ushio-Fukai et al. 2005). La GTPase ARF6 régule l'autophosphorylation de VEGFR2 et l'activation de la protéine Rac1 ainsi que l'association de VEGFR2 avec Cavéoline-1 (Ikeda, Ushio-Fukai et al. 2005). L'expression d'une forme dominant négative de cette GTPase bloque l'induction du signal VEGF. Les isoformes du VEGF liant la matrice extracellulaire sont capables de ralentir l'internalisation du récepteur VEGFR2, favorisant ainsi une activation plus longue et plus intense de ERK (Tan, Popel et al. 2013). Une étude récente a montré que Nrp-1 peut également influencer le trafic de VEGFR2 dans les cellules endothéliales et d'orienter VEGFR2 vers les voies de recyclage via Rab11 plutôt que vers les voies de dégradation (Ballmer-Hofer, Andersson et al. 2011). Cette régulation du recyclage de VEGFR2 par Nrp-1 requiert une protéine, la Synectine, interagissant avec la partie C-terminale de Nrp-1. Nrp-1, comme VEGFR2, est internalisé après fixation du VEGF et fait intervenir le même mécanisme d'internalisation via la voie Clathrine (Salikhova, Wang et al. 2008). La fixation du VEGF de façon simultanée sur Nrp-1 et VEGFR2 permet la création du complexe Nrp-1-VEGFR2. La formation de ce complexe est renforcée par l'interaction de Synectine avec le domaine PDZ de la Nrp-1 (Prahst, Heroult et al. 2008). Ce complexe VEGFR2-Nrp-1-Synectine interagit avec le moteur Myosine IV, qui facilite le trafic intracellulaire de VEGFR2 et l'activation des différentes voies de signalisation (Lanahan, Hermans et al. 2010). L'absence de Synectine chez les souris ralentit le trafic intracellulaire de VEGFR2, favorise sa déphosphorylation via la phosphatase PTP1b, et inhibe la signalisation sous-jacente (Lanahan, Hermans et al. 2010). De la même façon, la délétion de la queue cytoplasmique de Nrp-1 empêche l'interaction avec Synectine et ralentit le trafic intracellulaire de VEGFR2. Ces différentes études soulignent le rôle important de Nrp-1 dans les processus d'angiogenèse, notamment artérielle (Lanahan, Zhang et al. 2013).



### III. Le VEGF et système nerveux

#### 1. Expression des récepteurs au VEGF dans le système nerveux

La mise en place du système nerveux central dérive des cellules indifférenciées dans les zones germinales bordant les ventricules ; ce sont les cellules souches multipotentes ou cellules de la glie radiale qui donnent naissance aux diverses cellules neurales que sont les neurones et les cellules gliales. Chez l'embryon, les ARN messagers des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 sont prépondérants dans les zones germinales des ventricules latéraux et du 3<sup>e</sup> Ventricule, entre le 13<sup>ème</sup> et le 20<sup>ème</sup> jour embryonnaire (E13-E20) (Kim, Choi et al. 2007). L'expression initialement restreinte aux zones germinales s'étend à la plaque corticale de toutes les régions du cortex. Au stade E20, l'expression de ces récepteurs se limite à la zone sous-ventriculaire, aux couches profondes de la plaque corticale, au subiculum et à la couche des cellules pyramidales de l'hippocampe, ainsi qu'aux noyaux thalamiques (Figure 5C). Cette expression initiale des récepteurs au VEGF dans le système nerveux central correspond aux régions qui expriment des niveaux élevés de VEGF (Breier, Albrecht et al. 1992). Ainsi, la libération du VEGF dans les zones germinales peut attirer les cellules endothéliales qui expriment les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2, et favoriser la formation de nouveaux vaisseaux dans le cortex en développement. Parallèlement, elle peut favoriser la prolifération et/ou la survie des cellules précurseurs neurales présentes dans ces régions. En effet, la perte d'expression sélective du VEGF dans ces cellules précurseurs provoque une réduction importante de la vascularisation du cortex couplée à une mort par apoptose des neurones corticaux et à une létalité néonatale des souris (Haigh, Morelli et al. 2003). Les auteurs de cette étude ont interprété cet effet létal comme la conséquence du défaut de vascularisation et non de la perte d'un l'effet trophique du VEGF directement sur les cellules précurseurs neurales. Ceci illustre toute la difficulté d'interpréter les effets du VEGF dans des modèles *in vivo* car ce facteur influence à la fois le système vasculaire et le système nerveux.



**Figure 5: Localisation des récepteurs au VEGF chez l'embryon et chez l'adulte.** A) Coupe sagittale d'un cerveau de souris C57Bl6 avec les différentes structures (coloration AchE) B) Coupe sagittale d'un cerveau de souris C57bl6 avec les différentes structures (coloration de Nissl) C) Expression de VEGFR1 et VEGFR2 chez l'embryon de souris au stade E20. On les retrouve principalement exprimés dans la couche profonde de la plaque corticale, le subiculum, la couche des cellules pyramidales de l'hippocampe et les noyaux thalamiques. D) Expression de VEGFR1 et VEGFR2 chez la souris adulte. On les retrouve principalement exprimés dans le cervelet, le cortex, le gyrus denté, le CA1 de l'hippocampe et le bulbe olfactif.

Les régions du cerveau qui expriment VEGFR1 et VEGFR2 à des stades plus tardifs restent complémentaires des zones d'expression et de libération du VEGF (Licht and Keshet 2013). En effet, on retrouve ce couple ligand/récepteur au niveau du cervelet (Maharaj, Saint-Geniez et al. 2006; Ruiz de Almodovar, Coulon et al. 2010), du cortex (Yang, Zhang et al. 2003; Maharaj, Saint-Geniez et al. 2006), du gyrus denté (Jin, Zhu et al. 2002; Yang, Zhang et al. 2003; Cao, Jiao et al. 2004), de la région CA1 de l'hippocampe (Yang, Zhang et al. 2003; Cao, Jiao et al. 2004), du bulbe olfactif (Maurer, Tripps et al. 2003; Maharaj, Saint-Geniez et al. 2006), des plexus choroïdes (Maharaj, Saint-Geniez et al. 2006; Kim, Choi et al. 2007), de la zone sous-ventriculaire (Jin, Zhu et al. 2002), et du flux rostral migratoire (Wittko, Schanzer et al. 2009) (Figure 5D). Dans ces différentes régions, le VEGF peut être exprimé par des neurones (Cao, Jiao et al. 2004; Ruiz de Almodovar, Coulon et al. 2010), des astrocytes (Cao, Jiao et al. 2004), ou des cellules endothéliales (Fischer, Sharma et al. 1995). Le VEGFR2 représente le principal médiateur de ce signal VEGF, en particulier dans les neurones (Ruiz de Almodovar, Lambrechts et al. 2009). Ce motif d'expression VEGF/VEGFR2 est associé au processus de neurogenèse (gyrus denté, zone sous ventriculaire) ou de migration neuronale (cervelet, flux rostral migratoire). Dans l'hippocampe, l'une des structures du cerveau essentielle aux processus d'apprentissage et de mémorisation, cette expression complémentaire du VEGF et de son récepteur VEGFR2 a motivé de nombreuses études ces dix dernières années qui ont démontré l'implication du VEGF dans la régulation des processus mnésiques.

## 2. Rôles trophiques du VEGF

### a) Rôle pro-survie du VEGF

L'une des fonctions trophiques importante du VEGF est d'assurer la survie des neurones. Cet effet neuroprotecteur du VEGF peut s'exercer directement sur les neurones et les cellules gliales indépendamment de son impact sur la vascularisation. Le VEGF favorise ainsi la survie *in vitro* des neurones du cortex et des neurones dopaminergiques de la substance noire, lorsque ces derniers sont cultivés en explants en l'absence de sérum (Silverman, Krum et al. 1999; Rosenstein, Mani et al. 2003). Cet effet concerne également les neurones du système nerveux périphérique des ganglions de la racine dorsale. L'ensemble de ces études s'intéressant à l'impact du VEGF sur les neurones du système nerveux central (comme les



neurones hippocampiques, corticaux, ou dopaminergiques) ou périphérique ont montré qu'il permet de contrecarrer les effets délétères de l'hypoxie, de la privation de sérum, et des stimuli excitotoxiques. L'un des exemples les plus spectaculaires de cet effet neuroprotecteur du VEGF concerne la pathologie de la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Cette maladie neurodégénérative essentiellement sporadique a un pronostic sombre et s'accompagne de la dégénérescence des motoneurones de la moelle épinière et du tronc cérébral (Storkebaum, Lambrechts et al. 2005). La découverte de l'implication du VEGF dans cette pathologie provient d'une étude sur un modèle de souris génétiquement modifié qui est caractérisé par la perte de l'élément de réponse à l'hypoxie dans le promoteur du VEGF. Ces animaux présentent à l'âge adulte une réduction des taux de VEGF et manifestent une paralysie progressive de leurs membres due à une dégénérescence des motoneurones (Oosthuysen, Moons et al. 2001). Cette évolution progressive est en effet similaire au phénotype de souris transgéniques exprimant la forme humaine mutée de l'enzyme super oxyde dismutase 1 (SOD1) impliquée dans la maladie - *SOD1*<sup>G93A</sup>, (Storkebaum, Lambrechts et al. 2005) - et évoque le tableau clinique des patients atteints de SLA. L'infusion continue de VEGF dans le ventricule latéral de rats *SOD1*<sup>G93A</sup> permet de maintenir la fonction et l'activité des motoneurones en prolongeant leur survie, sans pour autant inverser durablement l'effet délétère de la pathologie (Storkebaum, Lambrechts et al. 2005). Cet effet du VEGF *in vivo* met en jeu directement les récepteurs VEGFR2 des motoneurones car lorsque des souris surexprimant VEGFR2 dans les neurones sont croisées avec des souris *SOD1*<sup>G93A</sup>, la mort des motoneurones est retardée et la survie des animaux prolongée (Storkebaum, Lambrechts et al. 2005). Réciproquement, l'injection d'un vecteur lentiviral codant pour le gène du VEGF permet en une seule injection dans différents muscles de ralentir la progression de la SLA chez les mêmes souris (Azzouz, Ralph et al. 2004). De manière générale, l'effet neuroprotecteur direct du VEGF sur les neurones est la conséquence de l'activation des récepteurs VEGFR2 sur ces mêmes neurones. Dans des modèles d'épilepsie, l'augmentation des taux de VEGF dans l'hippocampe permet de minimiser la perte neuronale induite par l'excitotoxicité. Au contraire, l'infusion de la forme courte et soluble du récepteur VEGFR1 (Flt1-fc), qui piège le VEGF, aggrave l'impact de ces épisodes épileptiques (Nicoletti, Shah et al. 2008). Le VEGF peut également réduire les décharges spontanées dans des tranches d'hippocampe de rat présentant des crises épileptiques (McCloskey, Croll et al. 2005). La surexpression neuronale du VEGFR2 et son impact sur l'augmentation du seuil des décharges épileptiques est un

argument fort en faveur d'un rôle direct du VEGF sur les neurones dans ces modèles (Nikitidou, Kanter-Schlifke et al. 2012). La survie des neurones induite par le VEGF implique l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires. En effet, la voie ERK, voie classiquement impliquée dans les processus de survie, est activée en présence de VEGF. On note une phosphorylation importante de ERK dans les neurones exposés à une période d'ischémie (Slevin, Krupinski et al. 2000). Dans les modèles d'hypoxie ou de SLA, la survie des neurones implique également l'activation de la voie PI3K/Akt directement par VEGFR2 (Wick, Wick et al. 2002; Li, Xu et al. 2003). Enfin, le VEGF, via l'activation de VEGFR2, bloque l'activation de la Caspase 3, qui est une protéine effectrice de la mort cellulaire par apoptose (Jin, Mao et al. 2001). L'action neuroprotectrice du VEGF ne se limite pas aux neurones car elle concerne également les cellules gliales (Sondell, Lundborg et al. 1999; Schmid-Brunclik, Burgi-Taboada et al. 2008). La survie des cellules gliales est également régulée par l'activation de VEGFR2 et l'induction de la voie ERK (Chow, Ogunshola et al. 2001; Freitas-Andrade, Carmeliet et al. 2008).

#### b) Rôle du VEGF dans la croissance axonale

Un autre aspect du rôle trophique du VEGF s'observe lors de l'établissement des réseaux neuronaux : il stimule la croissance des neurones en culture dans des modèles d'explant mésencéphalique (Silverman, Krum et al. 1999). En effet, dans ce modèle, l'addition de VEGF favorise la pousse des neurites des neurones corticaux cultivés *in vitro* et cet effet met en jeu spécifiquement le VEGFR2 (Rosenstein, Mani et al. 2003). L'ajout de VEGF dans le milieu de culture provoque l'augmentation de marqueurs neuronaux comme MAP2 ou TUJ1, et les taux d'ARNm de VEGFR2 (Khaibullina, Rosenstein et al. 2004). Cet effet du VEGF est spécifique de VEGF-A et ne peut pas être reproduit avec le VEGF-B ou PlGF (Jin, Mao et al. 2006). La croissance des neurites en réponse au VEGF résulte principalement de l'activation des voies PI3K/Akt et MAPK/ERK (Rosenstein, Mani et al. 2003; Khaibullina, Rosenstein et al. 2004). Cependant, d'autres voies de signalisation participent à cet effet, et notamment la voie Rho Kinase (ROK) via leur interaction avec VEGFR2 (Jin, Mao et al. 2006). L'impact du VEGF dans la croissance axonale a été étudié dans d'autres systèmes comme les ganglions spinaux de la racine dorsale (DRG, dorsal root ganglion) (Sondell, Sundler et al. 2000), la rétine au cours du développement ou après un épisode ischémique (Bocker-Meffert, Rosenstiel et al. 2002).

### c) Rôle du VEGF dans la Prolifération

La prolifération neuronale est le processus par lequel les cellules souches neurales se multiplient. Nous avons vu plus haut que le VEGF permet la prolifération des cellules endothéliales. Qu'en est-il au niveau du système nerveux ?

On peut noter que VEGF n'induit pas seul la prolifération des cellules souches neurales, mais que cette prolifération est en réalité le fruit d'un microenvironnement favorable. Le bFGF, facteur de croissance libéré par les cellules gliales et endothéliales, permet l'activation de la voie ERK. L'activation de cette voie permet d'activer à son tour VEGFR2. Cette activation préalable de VEGFR2 via le bFGF est nécessaire à la prolifération induite par VEGF (Xiao, Kong et al. 2007). L'environnement cellulaire est également important pour l'induction de la prolifération. Les cellules endothéliales micro-vasculaires (CMEC) co-cultivées avec des cellules souches neurales stimulent la prolifération de ces dernières. VEGF, comme CMEC, entraîne la prolifération des cellules souches neurales en inhibant leur entrée en différenciation (Guo, Shi et al. 2010). De façon générale, l'angiogenèse favorise la prolifération des cellules souches neurales (Sun, Sha et al. 2010). L'implantation de microcapsule de VEGF dans le cortex cérébral de souris modèles pour la maladie d'Alzheimer favorise la prolifération des cellules souches neurales dans les zones de neurogenèse telle que le gyrus denté de l'hippocampe, suggérant un rôle potentiel thérapeutique du VEGF dans cette pathologie (Antequera, Portero et al. 2012).

Le VEGF permet également de stimuler la prolifération des cellules gliales. Sous l'effet du VEGF, les voies ERK et Akt sont activées dans la microglie via l'activation de VEGFR1, favorisant leur prolifération (Forstreuter, Lucius et al. 2002). Contrairement à la microglie, la prolifération des astrocytes est régulée par l'activation de VEGFR2 (Freitas-Andrade, Carmeliet et al. 2008; Wuestefeld, Chen et al. 2012). En condition hypoxique ou anoxique, la prolifération des astrocytes est augmentée. Ce phénomène est dû à la libération de VEGF par les astrocytes eux-mêmes via l'induction de la voie HIF-1a (Schmid-Brunclik, Burgi-Taboada et al. 2008). Cependant, la prolifération des précurseurs gliaux est également régulée par VEGFC/D et leur récepteur VEGFR3. La fixation de VEGFC ou D sur VEGFR3 permet l'activation de la voie ERK (Kranich, Hattermann et al. 2009).

#### d) Rôle du VEGF dans la néo-neurogenèse (chez l'embryon) et neurogenèse (chez l'adulte)

La neurogenèse est le processus par lequel les cellules souches neurales se multiplient et se différencient en neurones fonctionnels. Le cerveau adulte garde des capacités de plasticité et donc de réorganisation grâce notamment à un processus continu de neurogenèse qui permet de palier certains déficits induits par des épisodes traumatiques, ischémiques ou des crises d'épilepsie par exemple. Dans le cerveau adulte, les cellules souches neurales prolifèrent et initient un processus de neurogenèse au sein de niches neurogéniques qui sont situées dans deux zones germinales de référence, la sous-ventriculaire (SVZ) et la sous-granulaire (SGZ) du gyrus denté de l'hippocampe (Palmer, Willhoite et al. 2000). La proximité des cellules endothéliales et des cellules souches neurales dans ces niches neurogéniques a motivé la recherche de signaux d'interaction entre ces deux types cellulaires. La culture d'explants de la Zone sous-ventriculaire en présence de cellules endothéliales a initialement révélé l'existence d'un effet trophique des cellules endothéliales sur les nouveaux neurones, mimé par l'action du BDNF (Leventhal, Rafii et al. 1999). Le VEGF produit par les cellules gliales ou les cellules souches neurales peut exercer une action paracrine et favoriser la libération de BDNF par les cellules endothéliales, qui stimulent en retour la neurogenèse. L'impact du VEGF sur la neurogenèse peut également provenir d'un effet direct sur les précurseurs neuronaux ou sur les cellules souches neurales. Les injections intracérébrales de VEGF chez le rat n'ont pas permis de trancher cette question car elles stimulent à la fois la neurogenèse, la prolifération astrocytaire et la croissance vasculaire dans les niches neurogéniques (Jin, Zhu et al. 2002). Deux voies de signalisation sont activées dans l'hippocampe de rats adultes par ces micro-infusions intracérébrales de VEGF : la voie PI3K/Akt et la voie MAPK/ERK (Fournier, Lee et al. 2012). Leur contribution est essentielle car le blocage spécifique des récepteurs VEGFR2 (par le SU5416) ou de chacune de ces voies de signalisation (avec LY294002 pour la voie PI3K/Akt ou U0126 pour la voie MAPK/ERK) abolit l'effet du VEGF sur la neurogenèse dans le Gyrus denté (Fournier, Lee et al. 2012). Ainsi, l'implication du couple VEGF/VEGFR2 et des voies de signalisation en aval est maintenant bien établie dans la neurogenèse adulte, même s'il demeure une incertitude sur la contribution des effets directs ou indirects du VEGF.

Je mentionnerai rapidement les autres membres de la famille des VEGFs qui interviennent également dans ce processus de neurogenèse et en particulier le rôle du couple VEGFC-

VEGFR3. L'utilisation d'un transgène qui permet d'identifier les cellules exprimant le VEGFR3 dans le cerveau adulte a montré que ces cellules sont des cellules souches quiescentes de la zone sous-ventriculaire (Calvo, Fontaine et al. 2011). La surexpression de VEGF-C stimule l'expression de VEGFR3 dans ces cellules souches et favorise la neurogenèse sans affecter le réseau vasculaire des niches neurogéniques. Cette démonstration confirme la contribution d'un effet direct des ligands VEGF sur la neurogenèse adulte. En revanche, aucune étude à ce jour n'a examiné le rôle différentiel des isoformes du VEGF (en particulier VEGF 120, 164 et 188), dans la régulation de la neurogenèse adulte. A ma connaissance, seule une équipe a commencé à aborder cette question en étudiant la neurogenèse pendant le développement embryonnaire du cortex. L'expression exclusive de l'isoforme 120 diffusible du VEGF provoque une diminution de la prolifération des progéniteurs de la zone ventriculaire sans affecter les progéniteurs neuronaux intermédiaires situés dans la seconde zone proliférative du cortex. Cette étude met en lumière le rôle essentiel du VEGF164 pendant la phase d'amplification des progéniteurs de la zone ventriculaire alors que le VEGF 120 permet de maintenir un pool de progéniteurs neuronaux aux capacités prolifératives réduites (Darland, Cain et al. 2011).

Comme modulateur de la neurogenèse, le VEGF offre donc des possibilités thérapeutiques intéressantes en réponse aux traumatismes ou aux altérations évoquées précédemment. L'hypothèse d'un rôle protecteur du VEGF découle des études montrant que les taux d'expression de VEGF sont augmentés significativement après un épisode traumatique ou épileptique (Nicoletti, Shah et al. 2008; Thau-Zuchman, Shohami et al. 2010). L'infusion chronique de VEGF a conforté cette hypothèse en montrant une réduction de la taille du traumatisme et un impact important du VEGF dans l'angiogenèse et la neurogenèse post-traumatique (Thau-Zuchman, Shohami et al. 2010).

### 3. Rôle du VEGF dans le guidage des neurones

Le VEGF, outre ces effets trophiques, peut exercer une activité chimiotropique et guider les neurones et les axones. Notre équipe a initié les recherches sur le rôle du VEGF dans la migration des cellules neurales en montrant que le VEGF entre en compétition avec la Sémaphorine 3A pour se lier au récepteur Neuropiline et stimuler *in vitro* la migration de cellules précurseurs via VEGFR2 (Bagnard, Vaillant et al. 2001). Cette orientation de la migration des cellules précurseurs induite par le couple VEGF/VEGFR2 peut être facilitée par

la présence d'autres facteurs de croissance tel que le fibroblast growth Factor 2 (FGF-2) (Zhang, Vutsits et al. 2003). En revanche, le récepteur VEGFR1 régule négativement ce processus de migration des précurseurs neuronaux dans le Flux Rostral Migratoire, par un contrôle du taux de VEGF libéré localement (Wittko, Schanzer et al. 2009). C'est l'utilisation de modèles de souris génétiquement modifiées qui a permis de démontrer l'implication *in vivo* du VEGF dans le guidage des neurones moteurs du nerf facial dans le Tronc Cérébral, pendant le développement embryonnaire (Schwarz, Gu et al. 2004). Schwarz et collaborateurs ont révélé que le guidage des neurones se distingue du guidage de leurs axones formant le nerf facial, car ces deux processus sont orchestrés par deux facteurs distincts, le VEGF et la Sémaforine 3A. Le VEGF164 oriente la migration des corps cellulaires et la Sémaforine 3A le guidage des axones, via un récepteur commun Nrp-1, mais indépendamment du récepteur VEGFR2. Ces différentes études mettent en lumière la complexité de la signalisation du VEGF qui met en jeu des complexes de récepteurs distincts pour réguler la migration cellulaire, indépendamment du système vasculaire. Récemment, notre équipe a montré pour la première fois la contribution de VEGFR2 dans la migration neuronale *in vivo*, au cours du développement postnatal du Cervelet, avec des souris transgéniques ou ayant une invalidation conditionnelle de VEGFR2. L'orientation de la migration des cellules granulaires du Cervelet est dictée par un gradient endogène des différentes isoformes du VEGF et requiert l'activation de leurs récepteurs VEGFR2 et des protéines kinases de la famille Src en aval (Ruiz de Almodovar, Coulon et al. 2010). Dans ces cellules, le VEGF favorise l'association du VEGFR2 avec le récepteur au glutamate de type NMDA, qui par l'intermédiaire des Src kinases, facilite l'entrée de calcium et la migration cellulaire (Meissirel, Ruiz de Almodovar et al. 2011).

Récemment, le rôle du VEGF dans les processus de guidage s'est élargi au guidage des axones. Plusieurs études ont révélé que le VEGF contrôle la trajectoire des axones au niveau des structures de la ligne médiane en favorisant leur passage du côté opposé du cerveau. Ainsi, l'expression du VEGF dans la partie médiane du chiasma optique permet de guider les axones du nerf optique qui expriment le récepteur Nrp-1 dans le tractus optique du côté opposé. L'invalidation de Nrp-1 perturbe la décussation des axones dans le chiasma optique et favorise une trajectoire ipsilatérale des axones (Erskine, Reijntjes et al. 2011). D'autres voies de projection axonale requièrent l'activation du récepteur VEGFR2 comme par exemple dans le cas du guidage des axones commissuraux dans la plaque du plancher. Dans ce système, le

VEGF libéré dans la plaque du plancher attire les axones des neurones commissuraux qui expriment VEGFR2 (Ruiz de Almodovar, Fabre et al. 2011). Des expériences d'inactivation sélective, du récepteur ou des kinases de la famille Src, ont démontré l'implication de la voie VEGF/VEGFR2/Src kinase dans ce processus de guidage. Au cours du développement embryonnaire, le VEGFR2 permet le guidage des axones du subiculum de façon indépendante du VEGF. Dans ces neurones, VEGFR2 forme un complexe de récepteurs avec PlexineD1 et Nrp-1. Ce complexe permet l'activation de VEGFR2 après fixation de Sema3E, permettant l'activation de la voie PI3K/Akt via Y1175 (Bellon, Luchino et al. 2010).

L'ensemble de ces études montrent l'importance de VEGFR2 et de ses partenaires dans la mise en place des différentes structures du cerveau. Mais, la voie VEGF est-elle seulement impliquée dans le développement et la mise en place des structures ou cette voie est-elle également impliquée dans d'autres processus comme l'activité neuronale ou la plasticité synaptique ?

#### 4. Régulation de l'activité neuronale par le VEGF

L'interaction évoquée précédemment dans les neurones immatures entre les récepteurs VEGFR2 et NMDA indique que le VEGF est un régulateur potentiel de l'activité des neurones. Dans les neurones hippocampiques, le VEGF a la capacité d'inhiber rapidement les courants potassiques à rectification sortante (courant IK), de manière dose dépendante, après seulement quelques secondes d'application (Xu, Zheng et al. 2003). Cet effet pourrait impliquer le récepteur VEGFR1 car la modulation des courants potassiques par le VEGF est observée uniquement dans les neurones qui expriment ce récepteur. Cependant, aucune démonstration fonctionnelle n'a confirmé la contribution des récepteurs VEGFR1 à ce jour. Comme ces courants potassiques sont essentiels au maintien du potentiel de repos de la membrane, à la phase de repolarisation et à la propagation du potentiel d'action, cette étude conforte donc l'hypothèse d'un rôle du VEGF dans l'activité neuronale. D'autres canaux ioniques sont modulés par le VEGF dans ces neurones et en particulier les canaux calciques activés par de fortes dépolarisations (Ma, Li et al. 2009). L'utilisation combinée de l'imagerie calcique et des enregistrements électrophysiologiques sur tranches d'hippocampe a permis à ces auteurs de montrer que le VEGF diminue de manière réversible les courants calciques induit par de fortes dépolarisations, ou courants calciques HVA (High Voltage Activated).

L'inactivation sélective du VEGFR2 dans ces neurones hippocampiques en culture bloque totalement l'effet du VEGF, impliquant la voie VEGF/VEGFR2 dans la modulation des canaux calciques HVA. Cet impact du VEGF conduit à limiter la concentration du calcium intracellulaire dans les cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe, suite à une activation intense du réseau. Ce processus de régulation peut permettre au VEGF d'exercer un rôle neuroprotecteur afin de prévenir la mort des neurones en cas de libération massive de glutamate lors d'épisodes ischémiques (Ma, Li et al. 2009). D'autres équipes ont montré que l'effet protecteur du VEGF dans des modèles ischémiques peut également s'expliquer par son action inhibitrice sur les courants potassiques induite par la phosphorylation du canal potassique Kv1.2 (Qiu, Zhang et al. 2003). L'ensemble de ces données suggère que le VEGF peut avoir des effets variés : d'une part il peut augmenter l'excitabilité des neurones avec la réduction des courants potassiques ou au contraire la diminuer avec la réduction des courants calciques.

Diminuer l'excitabilité des neurones peut permettre de les protéger dans un contexte d'hyperexcitabilité, comme par exemple dans le cas d'épisodes épileptiques. En effet, dans des tranches provenant de rats épileptiques, le VEGF permet de réduire les décharges spontanées des neurones de la région CA3 de l'hippocampe (McCloskey, Croll et al. 2005). Ces auteurs observent également une réduction de l'amplitude des réponses évoquées dans des neurones de différentes régions de l'hippocampe, en présence de VEGF. Ceci suggère que le VEGF peut contribuer à diminuer la transmission synaptique dans l'hippocampe, dans des conditions physiologiques. A l'inverse, d'autres études évoquent un effet opposé du VEGF sur la transmission synaptique excitatrice. Ainsi, la libération de VEGF induite par un facteur de réponse à l'hypoxie, HIF-1 (Hypoxia-Inducible factor-1), provoque une augmentation de la transmission synaptique dans les neurones de l'hippocampe, via VEGFR2 (Huang, Yang et al. 2010). L'expression de VEGF est également amplifiée dans ces mêmes neurones par l'activation de leurs récepteurs NMDA et l'augmentation du calcium intracellulaire qui en découle (Kim, Choi et al. 2008). Réciproquement, une application de VEGF stimule leurs récepteurs VEGFR2 et contribue à augmenter les taux de calcium intracellulaire à partir des réserves internes, via la voie PLCy, ou d'un influx via les canaux TRPC (Transient Receptor Potential Cation Channels) (Kim, Choi et al. 2008). Ces résultats apparemment contradictoires



suggèrent que le VEGF peut jouer un rôle de régulation clé en adaptant son impact sur la transmission synaptique en fonction de l'état d'activation du réseau.

### 5. Rôle du VEGF dans les processus mnésiques

L'augmentation des taux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire observée *in vitro* dans les neurones hippocampiques en présence de VEGF, favorise l'activation de la CaMKII (Kim, Choi et al. 2008), une protéine kinase impliquée notamment dans les processus de plasticité synaptique (Malinow, Madison et al. 1988; Malinow, Schulman et al. 1989).

L'activation de la CaMKII comme l'activation de la kinase ERK sont nécessaires pour que le VEGF puisse induire une augmentation de l'activité synaptique des neurones dans la région CA1 de l'hippocampe (Kim, Choi et al. 2008). Ces auteurs ont montré également par des enregistrements en potentiels de champs que l'application de VEGF avant l'induction d'un protocole de stimulation à haute fréquence facilite une forme de plasticité synaptique appelée potentialisation à long terme ou LTP. *In vivo*, les souris mutantes présentant une perte de fonction - par induction de la synthèse d'une forme soluble de VEGFR1 sous le contrôle du promoteur CaMKII spécifique du cerveau antérieur - ou gain de fonction – par induction de la synthèse de VEGFA-164 - ont une perturbation de leur capacité d'apprentissage (Licht, Goshen et al. 2011). Dans cette étude, les auteurs ont pris le soin de différencier l'apprentissage en lien avec la plasticité synaptique et l'apprentissage en lien avec la neurogenèse, démontrant que le VEGF permet de réguler les capacités d'apprentissage sans lien avec la neurogenèse. La perte de fonction VEGF, sans altérer ni la vascularisation cérébrale ni les capacités de neurogenèse, bloque l'expression de la LTP dans le gyrus denté de l'hippocampe (Licht, Goshen et al. 2011).

Ces données *in vivo* suggèrent un rôle potentiel du VEGF dans les processus de mémorisation et d'apprentissage. Des injections intracérébrales de vecteurs adénoviraux codant pour le VEGF ont confirmé que sa surexpression dans l'hippocampe améliore les capacités mnésiques des rats dans des tests de mémoire spatiale ou d'apprentissage associatif (Cao, Jiao et al. 2004). Réciproquement, l'apprentissage de tâches cognitives dépendant de l'hippocampe et des conditions environnementales enrichies, provoquent une augmentation des taux de VEGF dans cette structure (Cao, Jiao et al. 2004). Cet effet du VEGF sur l'apprentissage et la mémoire

dépend spécifiquement de VEGFR2, car son inhibition, via l'utilisation d'une forme dominant négative ou d'un inhibiteur bloque totalement l'effet (Cao, Jiao et al. 2004; Pati, Orsi et al. 2009). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'impact du VEGF sur les capacités mnésiques. Le VEGF peut :

- (1) promouvoir l'angiogenèse et l'apport en nutriments et en oxygène indispensables à l'activité neuronale, via son action sur les vaisseaux sanguins. Plusieurs études ont en effet montré que la surexpression de VEGF dans l'hippocampe par différentes approches (injection intracérébrale de vecteur d'expression ou souris transgéniques) stimule l'angiogenèse (Cao, Jiao et al. 2004; Licht, Goshen et al. 2011).
- (2) favoriser la neurogenèse et l'insertion dans le réseau hippocampique de nouveaux neurones impliqués dans le processus mnésique. Cette production de nouveaux neurones induite par le VEGF requiert le VEGFR2 et l'apport d'une forme mutante du récepteur bloque spécifiquement la neurogenèse sans affecter l'angiogenèse (Cao, Jiao et al. 2004). Une étude récente, qui utilise une approche de gain ou de perte de fonction pour faire varier les taux de VEGF, a démontré que la neurogenèse induite par ce facteur ne permet pas d'expliquer la variation à court terme des performances mnésiques. En effet, l'intégration des nouveaux neurones au réseau hippocampique est un processus plus lent que cette variation des performances mnésiques (Licht, Goshen et al. 2011).
- (3) moduler directement la plasticité synaptique des neurones de l'hippocampe. Il aurait en effet la capacité d'exercer un effet direct sur ces neurones *in vivo*. Le blocage de son expression endogène altère les processus mnésiques et inhibe l'expression de la potentialisation à long terme, indépendamment de son action sur la neurogenèse et l'angiogenèse (Licht, Goshen et al. 2011). L'impact direct du VEGF endogène sur l'activité et la plasticité synaptique des neurones de l'hippocampe reste néanmoins à démontrer.

L'ensemble de ces résultats mettent en exergue le rôle important du VEGF dans les processus d'apprentissage et de mémorisation, et plus particulièrement suggèrent son implication dans les processus de plasticité synaptique dans l'hippocampe.



## IV. La synapse glutamatergique

### 1. Transmission synaptique : généralités

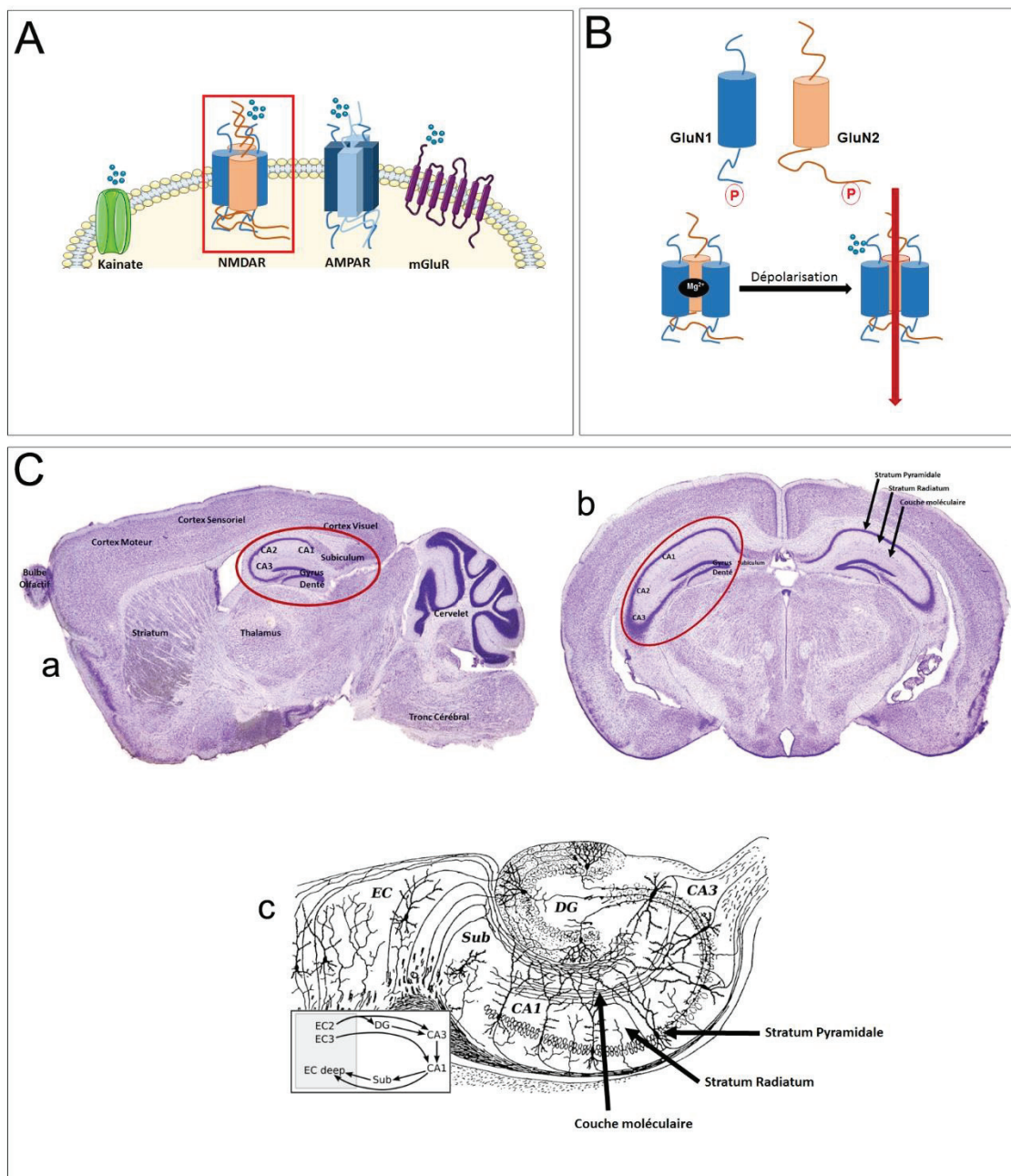
La transmission synaptique dans le système nerveux central est principalement un transfert d'information entre deux neurones sous la forme d'un signal chimique qui est libéré de la terminaison pré-synaptique vers les récepteurs de l'élément post-synaptique. Le message afférent qui arrive sur la dendrite ou le corps cellulaire d'un neurone est transformé par le jeu de différents récepteurs et de canaux ioniques en potentiel synaptique de type excitateur ou inhibiteur. L'ensemble de ces potentiels excitateurs et inhibiteurs va modifier le potentiel de membrane du neurone et déterminer si un potentiel d'action va se déclencher au niveau de l'axone. Le potentiel d'action a la capacité de se propager jusqu'à l'extrémité de l'axone appelée terminaison pré-synaptique, où il déclenche la libération vésiculaire par exocytose d'un signal chimique, le neurotransmetteur, dans la fente synaptique. La probabilité de libération du neurotransmetteur et donc sa quantité libérée dans la fente synaptique détermine l'amplitude de la réponse synaptique. Cette libération qui dépend du calcium est régulée par des récepteurs aux neurotransmetteurs et des protéines de signalisation présents au niveau de la terminaison pré-synaptique. La nature du neurotransmetteur et les propriétés des récepteurs post-synaptiques vont déterminer si la réponse synaptique est de nature excitatrice ou inhibitrice.

La majorité des synapses excitatrices sont de type glutamatergique avec le glutamate comme neurotransmetteur principal, qui se fixe sur des récepteurs situés essentiellement sur l'élément post-synaptique de ces synapses. On distingue plusieurs catégories de récepteurs au glutamate comme les récepteurs canaux ionotropiques de type AMPA (Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Méthylisoxazol-4-Propionate), NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate) et Kainate, ainsi que les récepteurs métabotropiques de la famille des mGluR. Je vais évoquer dans les paragraphes suivants plus particulièrement les récepteurs au NMDA qui ont fait l'objet de mon travail de thèse. Ces récepteurs sont des canaux voltage-dépendants dont l'ouverture est régulée par la fixation de leur ligand, physiologiquement le glutamate ou leur agoniste synthétique le NMDA. Ces canaux sont perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  qui est le cation qui leur confère un rôle important dans les processus de plasticité, mais ils laissent passer d'autres cations comme le  $\text{Na}^{+}$  ou le  $\text{K}^{+}$ . Ces

récepteurs sont également sensibles au  $Mg^{2+}$  qui bloque le pore du canal lorsque la membrane cellulaire est au potentiel de repos (Figure 6A et B).

## 2. Un modèle d'étude : l'hippocampe

La mémoire se définit par la capacité de maintenir une information à court terme pour pouvoir l'utiliser et par la possibilité de la stocker à plus long terme. On distingue différents types de mémoires, la mémoire à court terme appelée également mémoire de travail et la mémoire à long terme. Cette mémoire à long terme peut être de différente nature : la mémoire implicite permet d'acquérir et de restituer automatiquement de manière inconsciente des compétences acquises. La mémoire explicite où la restitution des souvenirs est cette fois consciente, correspond à la mémorisation des connaissances d'ordre générale mais également des différents épisodes de notre vie (Eichenbaum 2013). Les réseaux neuronaux responsables du stockage et de la restitution des informations sont maintenant bien connus et sont distribués dans plusieurs régions du cerveau. En particulier, le système limbique, qui est impliqué dans la gestion des émotions, des motivations et des comportements instinctifs joue un rôle capital dans la formation de la mémoire, en association avec le cortex cérébral (Eichenbaum 2013). Ce système comprend principalement le cortex limbique, la formation hippocampique, le noyau amygdalien et la région septale. Ce sont des études cliniques de patients atteints d'amnésie dans les années 1950 qui ont permis de commencer à identifier les structures anatomiques clés du système mnésique, comme l'hippocampe. Le patient H.M. (cas décrit par Scoville W et Milner B, 1957) a ainsi grandement contribué à améliorer notre compréhension de l'organisation de ce système car il s'est trouvé dans l'incapacité de former de nouveaux souvenirs après une ablation bilatérale de l'hippocampe pour soigner une épilepsie du lobe temporal. Le stockage des informations à long terme implique d'autres structures corticales, comme les Aires Associatives, le cortex pariétal, temporal et préfrontal, et l'hippocampe intervient dans la restitution des informations stockées.



**Figure 6: Récepteurs au glutamate et hippocampe.** **A)** Les différents récepteurs au glutamate du système nerveux central. De gauche à droite: les récepteurs Kainate, les récepteurs NMDA (NMDAR), les récepteurs AMPA (AMPA) et les récepteurs métabotropiques (mGluR). **B)** Récepteurs NMDA: ils sont composés de la sous unité obligatoire GluN1 associé aux sous-unités GluN2 (représentés ici) et/ou GluN3. Chacune des sous-unités présentent des sites de régulation par phosphorylation sur la queue C-terminale intracellulaire. Au potentiel de repos le pore de leur canal est bloqué par le magnésium. Ce blocage est levé par dépolarisation de la cellule. **C)** L'hippocampe. **a)** Coupe sagittale d'un cerveau de souris avec les différentes structures. Le cercle rouge labellise l'hippocampe. **b)** Coupe frontale d'une cerveau de souris avec l'identification des différentes régions et couches cellulaires de l'hippocampe. **c)** Représentation modifiée de l'hippocampe par Ramon Y Cajal. DG = Gyrus Denté, Sub = Subiculum, EC = Cortex Entorhinal.

La formation hippocampique a une organisation bien conservée chez les mammifères qui se compose du subiculum, du cortex enthorinal, de la corne d'Ammon et du gyrus denté. Le cortex enthorinal projette des axones dans la voie perforante qui passe à travers le subiculum et constitue la voie d'entrée de l'hippocampe. La corne d'Ammon, composée des régions CA1, CA2, CA3 et CA4, compose avec le gyrus denté l'essentiel de l'hippocampe. L'organisation des connexions entre ces différentes régions est stéréotypée et forme un circuit tri-synaptique (Li, Mu et al. 2009). Tout d'abord, les fibres perforantes contactent les cellules granulaires du gyrus denté qui à leur tour, via les fibres moussues, se projettent sur les dendrites des cellules pyramidales de CA3. Les axones de ces cellules pyramidales, appelés collatérales de Schaeffer établissent des contacts synaptiques avec les dendrites des cellules pyramidales de CA1, qui projettent en retour sur le subiculum ou le cortex enthorinal. Enfin, les projections commissurales émises à partir du CA3 contactent la région CA3 contra-latérale formant la commissure inter-hémisphérique (Li, Mu et al. 2009) (Figure 6C).

Depuis maintenant près de 40 ans, des études pionnières ont montré que le gyrus denté est le siège d'une neurogenèse continue chez l'adulte qui se déroule dans la zone Sous-granulaire du gyrus (Altman and Das 1965). Des études récentes ont confirmé que ces nouveaux neurones s'intègrent aux réseaux de l'hippocampe et participent à la rétention d'information (Li, Mu et al. 2009). Leur survie comme leur intégration au réseau peut être favorisée par un apprentissage dépendant de l'hippocampe (Li, Mu et al. 2009).

C'est l'étude de la transmission synaptique dans ce circuit tri-synaptique bien identifié, entre la Voie Perforante et les cellules granulaires du gyrus denté, qui a permis à Timothy Bliss et Terje Lomo de découvrir un mécanisme cellulaire essentiel de la plasticité synaptique (Bliss and Lomo 1973). Ces chercheurs ont montré qu'une stimulation de la Voie Perforante par des trains d'impulsion électrique brefs, entraîne une augmentation persistante de la force de la transmission synaptique appelée potentialisation à long terme, ou LTP (long term potentiation). Cette forme de plasticité synaptique qui représente une des bases cellulaires de la mémoire requiert l'activation de différents récepteurs post-synaptique, notamment les récepteurs glutamatergiques de types NMDA et AMPA. Ces récepteurs par leur activation permettent l'augmentation des taux de calcium dans l'élément post-synaptique, et l'activation en aval de voies de signalisation spécifiques qui représentent une des bases moléculaires de la mémoire (Cf chapitre Bases cellulaires de la mémoire).



### 3. La densité post-synaptique

La synapse glutamatergique excitatrice (ou synapse de type 1) a une structure très organisée formée des deux éléments pré- et post-synaptique séparés par une fente synaptique. L'élément pré-synaptique contient la machinerie nécessaire au processus d'exocytose du glutamate ainsi que les récepteurs et les protéines de signalisation qui vont réguler cette libération. L'élément post-synaptique comporte une région essentielle à la transmission synaptique, appelée densité post-synaptique, qui apparaît comme une région dense aux électrons en microscopie électronique. Ces densités post-synaptiques (PSD) sont situées sur des protubérances dendritiques, ou épines, dont on distingue trois catégories selon leur forme: les épines courtes (short), les épines tronquées (stubby) (avec une longueur inférieure à 0.5µm) et les épines en champignon (mushroom) (McKinney 2010) (Figure 7A). La protéine principale du cytosquelette des épines est l'Actine, qui leur confère une capacité de remodelage importante et rapide (Sekino, Kojima et al. 2007; Tataavarty, Das et al. 2012).

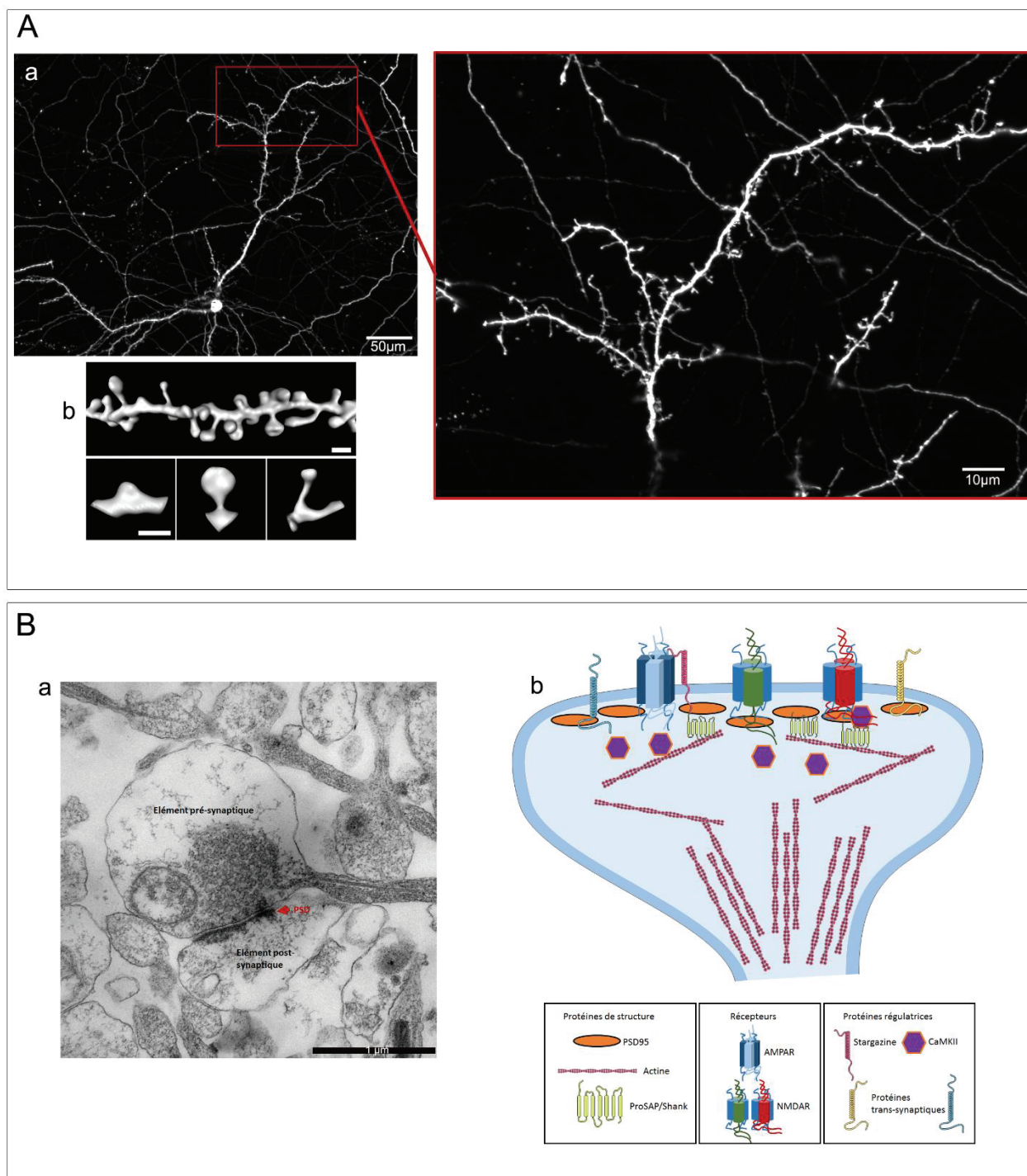
Les PSD sont constituées d'un réseau de protéines d'échafaudage qui se lient à une multitude de partenaires protéiques classés en six catégories : les protéines d'adhésion cellulaire, les protéines du cytosquelette, les adaptateurs protéiques, les récepteurs et canaux synaptiques, les protéines G et leurs modulateurs, et enfin les protéines de signalisation incluant les kinases et phosphatases (Boeckers 2006; Sheng and Kim 2011). L'identification des protéines constituant les PSD par des techniques de protéomique a permis de mettre à jour quatre cents protéines distinctes dont on connaît maintenant l'abondance relative. Ainsi la protéine majoritaire est la CaMKII (Ca<sup>2+</sup>/Calmoduline dépendent kinase II) qui est constituée d'un multimère formé à partir de deux sous-unités la CaMKII $\alpha$  et la CaMKII $\beta$  (Sheng and Kim 2011). Cette kinase est impliquée dans la régulation de la transmission et de la plasticité synaptique car elle module l'activité d'un grand nombre de récepteurs par phosphorylation, et participe au trafic des récepteurs AMPA ainsi qu'à l'ancrage des récepteurs NMDA à la synapse (Cf chapitre Bases cellulaires de la mémoire) (Figure 7B).

#### a) Les protéines d'échafaudage

D'autres protéines sont essentielles à l'organisation des PSD des synapses glutamatergiques. Il s'agit des protéines d'échafaudage de la famille de PSD-95 (PSD-95 ou SAP90, PSD93, SAP97



et SAP102 ; SAP = Synapse Associated Protein). Elles appartiennent à une sous-famille des protéines MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinases) qui sont ubiquitaires et concentrées aux zones de contact cellule-cellule, comme les synapses, dans les PSD et les zones actives de l'élément pré-synaptique (Verpelli, Schmeisser et al. 2012). Ces PSD-MAGUK possèdent plusieurs domaines d'interaction protéique, dont un domaine homologue au domaine Guanylate kinase (GK) des levures en partie C terminale, un domaine SH3 (Src Homology 3 Domain) et un domaine PDZ (PSD = PSD-95/DLG (Discs Large)/ZO-1 (Zonula Occludens)). Les domaines GK et SH3 se regroupent afin de former une super structure nécessaire au bon fonctionnement de ces protéines (Verpelli, Schmeisser et al. 2012). Les PSD-MAGUK sont principalement impliquées dans la régulation du trafic des récepteurs glutamatergiques à la synapse et de leur ancrage dans la PSD (Sans, Prybylowski et al. 2003; Elias and Nicoll 2007). PSD-95 est la protéine la plus étudiée et la plus connue de cette sous-famille. Elle possède trois sites PDZ dans sa partie N-terminale qui interagissent avec les domaines PDZ C-terminaux de multiples canaux et récepteurs, notamment les récepteurs NMDA et AMPA. Son interaction est directe avec les récepteurs NMDA alors qu'elle est indirecte avec les récepteurs AMPA et se fait via la Stargazine, une protéine transmembranaire qui régule le trafic de ces récepteurs à la membrane et leur ancrage au niveau synaptique (Kornau, Schenker et al. 1995; Bats, Groc et al. 2007). Cette capacité d'interaction avec les récepteurs au glutamate confère à la PSD-95 un rôle important dans les processus de plasticité synaptique. Ainsi, la surexpression de cette protéine dans les neurones hippocampiques augmente le pool et l'activité des récepteurs AMPA synaptiques, et provoque l'apparition de nouvelles épines et une augmentation de leur taille (El-Husseini, Schnell et al. 2000). La PSD95 a également la capacité d'interagir avec des enzymes comme la nNOS (neuronal Nitric Oxide Synthase), qui favorise la production de Monoxyde d'Azote (NO), en formant un complexe ternaire avec les récepteurs NMDA. Ce complexe ternaire est impliqué dans les processus de plasticité synaptique et joue également un rôle dans les processus ischémiques car le blocage de l'interaction entre PSD95 et nNOS permet de limiter la mort des neurones par excitotoxicité (Zhou, Li et al. 2010). Il pourrait enfin favoriser la formation de nouvelles synapses et induire une modification morphologique des épines (Nikonenko, Boda et al. 2008).



Les propriétés de ces PSD-MAGUK sont finement régulées par différentes kinases qui peuvent phosphoryler chacune un ou plusieurs sites de ces protéines. Ainsi si l'on considère la PSD95, deux kinases en particulier peuvent la phosphoryler sur des résidus distincts et exercer des actions antagonistes. La kinase JNK-1, qui phosphoryle la Ser295 de la PSD95, permet son enrichissement synaptique (Pavlovsky, Gianfelice et al. 2010) et favorise l'insertion des récepteurs AMPA (Kim, Futai et al. 2007), alors que la CaMKII (Ser73) diminuerait son expression synaptique par rupture de sa liaison avec les récepteurs NMDA (Gardoni, Polli et al. 2006). Enfin, le trafic à la synapse des PSD-MAGUK ou leur dégradation dépendent de l'activité synaptique et des voies de signalisation en aval (CREB, MAPK...) (Ehlers 2003).

La famille des protéines d'échafaudage ProSAP/Shank (Proline-rich Synapse Associated Protein / SH3 Domain and Multiple Ankyrin Repeats) joue un rôle essentiel dans l'organisation des PSD où elles contrôlent les interactions protéine-protéine via leurs domaines conservés, SH3, PDZ en N terminale, et SAM (Sterile Alpha Motif Domain) en C terminale. Il existe trois membres Shank1-3 et seul Shank1 est spécifique du système nerveux. Les domaines mis en jeu dans l'adressage synaptique de ces protéines Shank varient en fonction du membre concerné car le domaine PDZ détermine la localisation synaptique de Shank1 et le domaine SAM celle de Shank2 et Shank 3 (Verpelli, Schmeisser et al. 2012). Les protéines Shank interagissent avec de nombreux partenaires qui incluent d'autres protéines d'échafaudage, des adaptateurs, des protéines du cytosquelette mais aussi des canaux et des récepteurs glutamatergiques post-synaptiques. Ces interactions directes ou indirectes (via des adaptateurs) entre Shank, les récepteurs au glutamate et l'Actine contrôlent le ciblage de ces récepteurs et leur maintien à la synapse. Une autre fonction de ces protéines est de permettre la relocalisation des récepteurs à l'IP3 (Inositol-Tri-Phosphate) et des citernes internes du réticulum endoplasmique dans l'épine et d'assurer un contrôle local de l'homéostasie calcique dans la PSD (Sala, Roussignol et al. 2005). Ainsi ces protéines jouent un rôle clé à l'interface entre l'activation des récepteurs synaptiques et les voies de signalisation dépendant du calcium, qui peut se révéler essentiel dans le remodelage des synapses au cours de la plasticité synaptique.

### b) Protéines synaptiques associées au cytosquelette

Les épines dendritiques sont des structures très dynamiques dont le remodelage pendant les processus de plasticité synaptique est rapide et dépend du cytosquelette d'Actine. En effet, cette protéine majoritaire des épines dendritiques (Sheng and Kim 2011), joue un rôle d'organisateur central dans la régulation de l'activité synaptique et de la forme des épines (Saneyoshi and Hayashi 2012). L'Actine se présente sous plusieurs formes suivant la région de l'épine concernée. De courts filaments réticulés et ramifiés se concentrent à la tête de l'épine, de longs filaments sont présents dans le cou, et la base de l'épine contient quant à elle une organisation en delta qui est issue du tronc dendritique (Saneyoshi and Hayashi 2012). La régulation de la forme de l'Actine et de sa fonction est assurée par de multiples kinases, notamment les Rho kinases. Lorsque leur activité qui dépend en partie des récepteurs NMDA et de la CaMKII est inhibée, la restructuration morphologique et la croissance de l'épine ne peut plus se produire (Svitkina, Lin et al. 2010). D'autres protéines comme les ABP (Actin Binding Proteins) interviennent dans la régulation de la forme de l'Actine et sont responsables du passage de la forme globulaire de l'Actine (G-actin), distribuée de manière uniforme dans les dendrites, à la forme fibrillaire (F-Actin), enrichie dans les épines. Le principal complexe protéique qui sert de catalyseur à la formation du réseau d'Actine réticulé est le complexe Arp2/3 (Actin Related Protein 2 & 3). Il est indispensable à la mise en place des synapses et favorise la mobilisation de l'Actine pendant le remodelage morphologique de l'épine induit par les processus de plasticité synaptique (LTP). Arp2/3 est régulé négativement par PICK1, une protéine de liaison à l'Actine qui inhibe la polymérisation de l'Actine et contrôle la morphologie des neurones. PICK1 est également un acteur essentiel de l'endocytose des récepteurs glutamatergiques et facilite ainsi l'induction d'un autre type de plasticité, la LTD (Dépression à Long Terme) (Rocca, Martin et al. 2008). Parallèlement la protéine Eps8 qui associe les filaments d'Actine entre eux contribue également à bloquer leur polymérisation. Elle est particulièrement enrichie dans les épines et favorise leur formation par cette action inhibitrice sur la polymérisation des monomères de G-Actine (Menna, Zambetti et al. 2013; Stamatakou, Marzo et al. 2013). Des souris génétiquement modifiées et privées d'Eps8 présentent un défaut d'apprentissage et une altération de la LTP liés à une morphologie anormale de leurs dendrites et de leurs épines (Menna, Zambetti et al. 2013). D'autres ABP qui dépolymérisent les filaments d'Actine jouent un rôle important dans l'expression de la plasticité synaptique en régulant cette fois la mobilité des récepteurs glutamatergiques dans

la membrane. Ainsi, la n-Cofiline stimule la diffusion membranaire des récepteurs AMPA extra-synaptiques et facilite l'expression de la LTP (Rust, Gurniak et al. 2010). L'ensemble de ces études souligne le rôle central des protéines de liaison à l'Actine qui coordonnent finement la dynamique du cytosquelette et assurent la formation, le maintien ou l'élargissement des épines en réponse à l'activité synaptique. Maintenant, la question se pose de connaître les acteurs qui permettent d'établir une coordination adéquate entre les différents éléments de la synapse, c'est à dire entre les éléments pré et post-synaptique.

### c) Interactions trans-synaptiques

Les interactions trans-synaptiques entre molécules d'adhérence ont été classiquement interprétées comme le support de l'alignement des éléments pré et post-synaptiques et du maintien de l'espace de la fente synaptique. Cependant, ce type d'interaction entre molécules de la famille des SynCAM, Cadhérines, Neurexines, Neuroligines, SALM ou Ephrines jouent un rôle important dans la formation et la fonction synaptique car elles régulent également l'expression des récepteurs à la synapse, la transmission et la plasticité synaptique. Les Neurexines, protéines transmembranaires pré-synaptiques, interagissent avec les Neuroligines situées sur l'élément post-synaptique, via leur domaine extracellulaire (Ichtchenko, Hata et al. 1995). Ce couple Neurexine-Neuroligine stabilise les contacts synaptiques, favorise la différenciation des synapses et stimule à la fois l'adressage de PSD95 et le regroupement des récepteurs NMDA à la synapse (Krueger, Tuffy et al. 2012). Récemment, LRRTM2 (Leucine Rich Repeat Transmembrane Protein), un nouveau partenaire liant les Neurexines a été identifié. Il exerce des fonctions similaires à celles des Neuroligines dans la formation des synapses excitatrices (de Wit, Sylwestrak et al. 2009; Ko, Zhang et al. 2009), favorise le recrutement de PSD95 et des récepteurs AMPA aux synapses (de Wit, Sylwestrak et al. 2009) et régule la LTP (Soler-Llavina, Arstikaitis et al. 2013).

Les Ephrines et leurs récepteurs Eph sont des protéines transmembranaires qui permettent l'échange d'un signal bidirectionnel de l'élément pré vers l'élément post-synaptique et réciproquement. Des expériences de perte et de gain de fonction ont caractérisé leur rôle dans la mise en place de nouveaux contacts synaptiques, l'activation des récepteurs au glutamate à la synapse, et la régulation de la forme et de la taille des épines pendant les processus de plasticité (Klein 2009; Hruska and Dalva 2012). Enfin, je vais évoquer une

dernière famille de protéine, moins connue, qui participe à la formation des contacts pré et post synaptiques ainsi qu'à la fonction synaptique. Les SALM (Synaptic Adhesion Like Molecules) ont été décrites pour la première fois en 2006 (Ko, Kim et al. 2006; Wang, Chang et al. 2006). Ces auteurs ont démontré l'implication de ces protéines pré et post-synaptiques dans la formation des synapses et dans le recrutement des récepteurs NMDA, notamment par l'intermédiaire d'une interaction avec la sous unité GluN1 de ces récepteurs et avec la PSD95 (Wang, Chang et al. 2006).

La synapse glutamatergique excitatrice est donc une structure d'architecture complexe, capable d'un remodelage et d'une réorganisation rapide en réponse à l'activité électrique des neurones interconnectés. Son organisation multiprotéique forme des réseaux qui sont en interaction constante, des récepteurs au cytosquelette, et régulent l'activation de voies de signalisation selon une cinétique précise. L'ensemble de ces processus contribue à moduler la transmission et la plasticité synaptique qui constituent la base cellulaire des processus mnésiques.





## V. Les récepteurs du glutamate de type NMDA

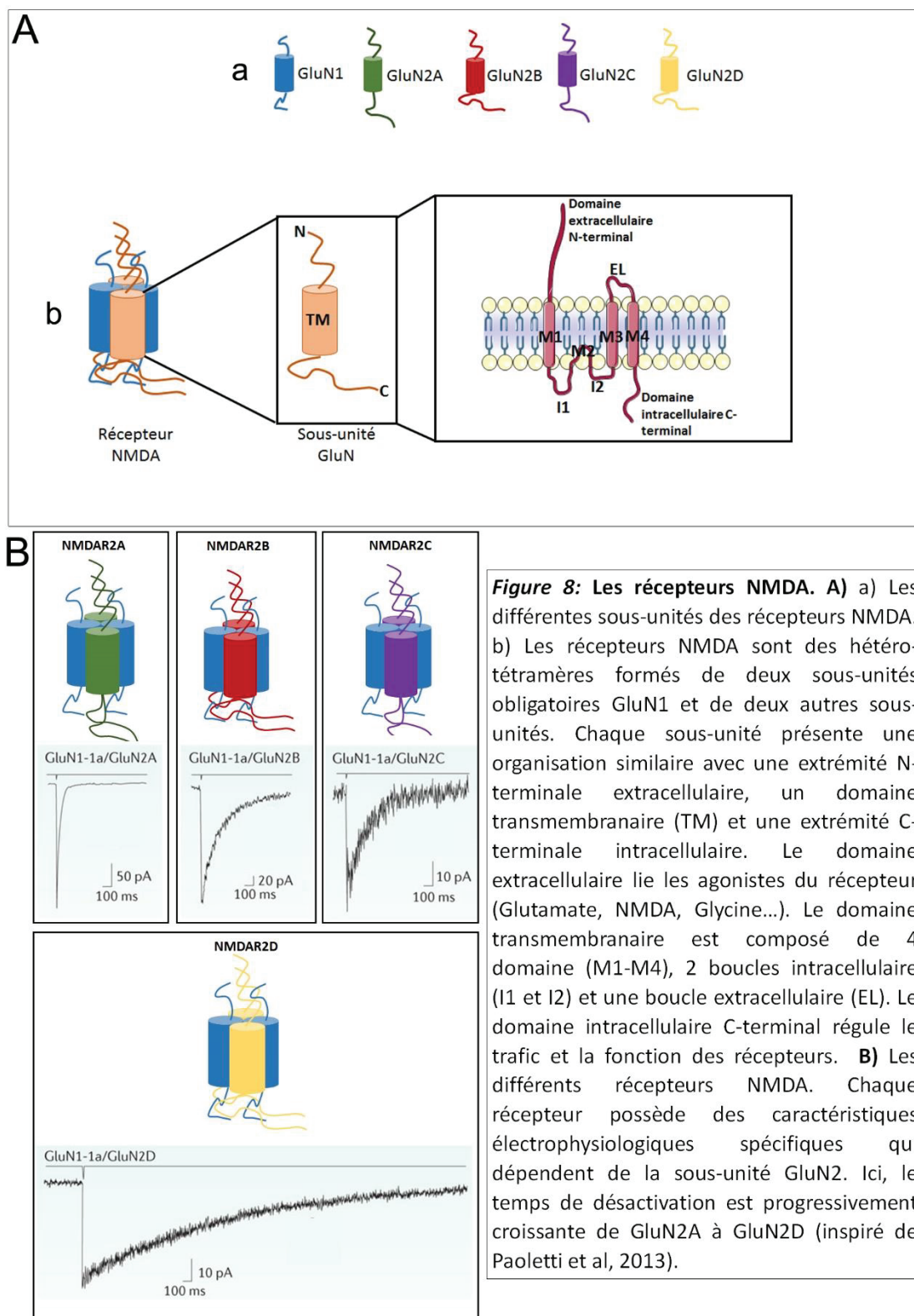
### 1. Les différentes sous-unités du NMDAR

Les récepteurs au glutamate de type NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique) NMDAR sont des hétérotétramères composés de 2 sous-unités obligatoires GluN1 liant la glycine ou la D-Sérine, en association avec 2 sous-unités GluN2 (A-D) liant le glutamate ou l'agoniste pharmacologique NMDA, ou 2 sous-unités GluN3 (A-B) qui transforme les récepteurs NMDA en récepteurs exclusivement à la Glycine ou à la D-Sérine. La sous-unité GluN1 contrôle le trafic des récepteurs NMDA du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique (Standley, Roche et al. 2000). Les sous-unités GluN2 déterminent quant à elles les propriétés biophysiques des récepteurs comme la conductance, la probabilité d'ouverture du canal, la cinétique d'activation et de désactivation des courants, ou la sensibilité au  $Mg^{2+}$  (Gielen, Siegler Retchless et al. 2009; Yuan, Hansen et al. 2009). En effet, les NMDAR se distinguent des autres récepteurs ionotropiques au glutamate par le blocage du pore de leur canal par les ions  $Mg^{2+}$  au potentiel de repos de la membrane ; seule une dépolarisation de la cellule permet de lever ce blocage. On peut noter que l'association entre ces sous-unités GluN1 et GluN2 semble nécessaire pour permettre l'adressage des récepteurs NMDA à la membrane plasmique (Petrulia, Al-Hallaq et al. 2009). L'antagoniste classiquement utilisé des récepteurs NMDA est l'APV (acide DL-2-amino-5-phosphonopentanoïc), qui se fixe sur le site de liaison au glutamate des sous-unités GluN2 et empêche sa fixation par compétition. Il existe également des bloqueurs non compétitifs qui bloquent de manière irréversible les récepteurs NMDA actifs dont le canal est ouvert ; il s'agit du MK-801 et de la mémantine (Paoletti and Neyton 2007) (Figure 8).

#### a) La sous-unité GluN1

Le gène *grin1* (ou encore appelé NMDAR1 ou zeta-1), code pour la sous-unité GluN1 des récepteurs NMDA et se localise chez l'homme sur le chromosome 9 (9q34.3) avec une séquence de 31kb qui contient 21 exons. L'épissage alternatif de son ARN messager peut former 8 isoformes qui se distinguent par leur sensibilité au PH et aux polyamines. GluN1 se compose de 4 parties distinctes qui incluent une extrémité N-terminale extracellulaire avec le site de liaison à l'agoniste, quatre domaines transmembranaires M1 à M4 dont M2 est une boucle réentrante, et un domaine C-terminal intracellulaire (Paoletti, Bellone et al. 2013).



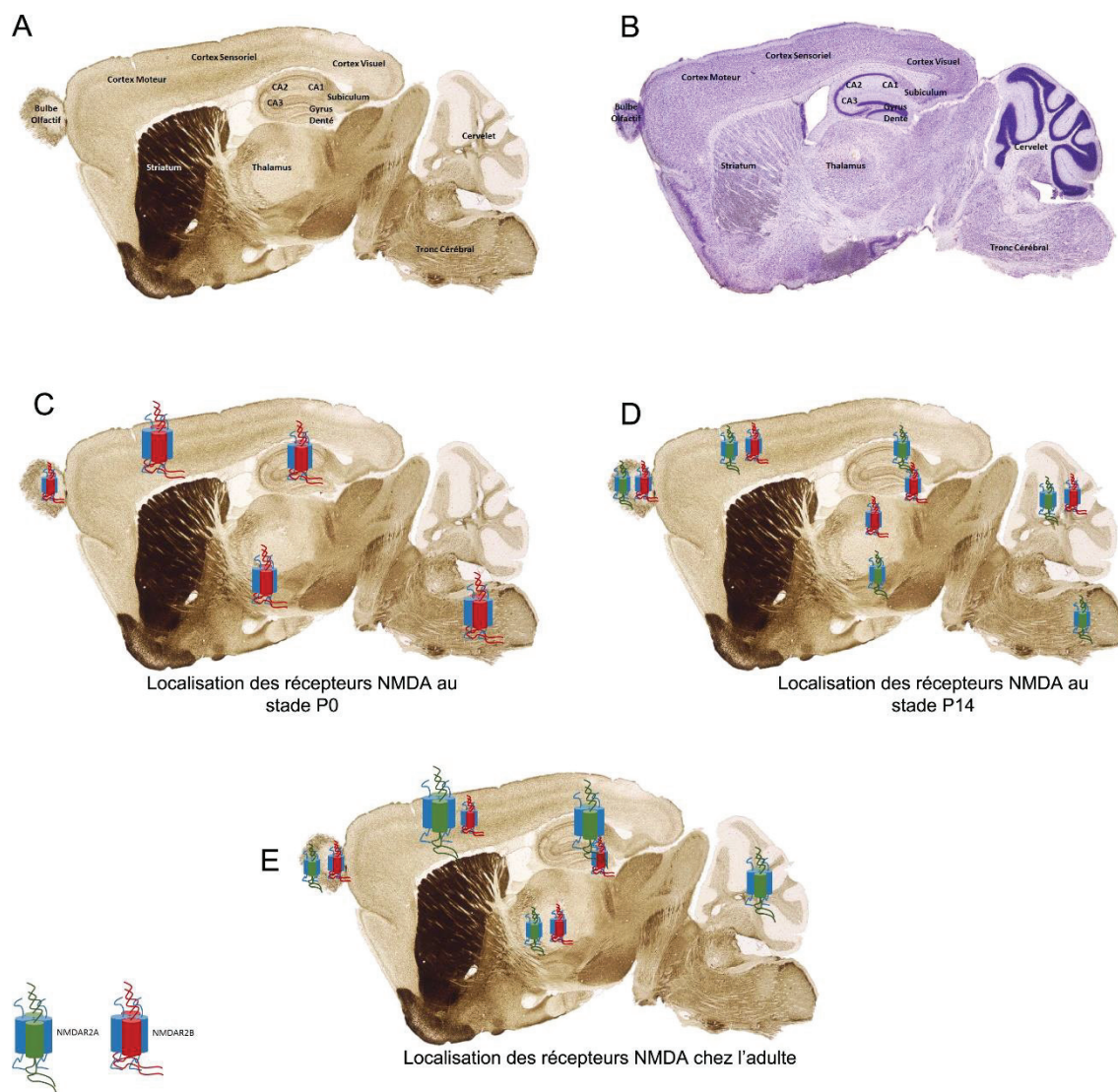


L'extrémité N-terminale de GluN1 (NTD) est homologue à une protéine bactérienne LIVBP (Bacterial periplasmic leucine/isoleucine/valine binding domain) et intervient dans l'assemblage des sous-unités en récepteur fonctionnel et dans la régulation allostérique. Le domaine de liaison à l'agoniste (ABD) forme une structure en coquille qui regroupe les domaines S1 et S2, et constitue le site de liaison à la glycine ou la D-Sérine. Le domaine transmembranaire (TMB) est quant à lui responsable de la sélectivité ionique du canal. Enfin, le domaine C terminal (CTD) initie l'activation de voies de signalisation spécifiques et régule l'adressage des récepteurs et leur ancrage à la membrane. Chez la souris (*mus musculus*), qui est notre modèle d'étude, GluN1 est une protéine de 885 acides aminés de masse moléculaire 110 kDa, dont les différents domaines sont respectivement localisés entre les acides aminés 8 et 383 pour NTD, entre 42 à 357 pour ABD et entre 457 à 552 pour TMB, le domaine CTD se compose du Calmodulin-binding domain entre 835 à 863 (Protein Database, NCBI).

#### b) Les sous-unités GluN2

Les sous-unités GluN2 (GluN2A à GluN2D) sont codées par quatre gènes distincts appelés Epsilon (E1 à 4) ou *grin2* (respectivement *grin2a* à *grin2d*) qui sont situés sur quatre chromosomes différents : 16p13.2 pour *grin2a*, 12p13.1 pour *grin2b*, 17q25.1 pour *grin2c* et 19q13.33 pour *grin2d*. Elles présentent une architecture protéique comparable à celle de GluN1, organisée en 4 modules distincts NTD, ABD, TMB et CTD, qui se succèdent de l'extrémité N à l'extrémité C terminale de la protéine. Le domaine ABD se distingue de celui de GluN1 car il contient le site de liaison au glutamate ou au NMDA. De même, le domaine C terminal est variable d'une sous-unité à l'autre car il contient des domaines PDZ et des sites de phosphorylation spécifiques. Cette caractéristique permet à chaque sous-unité d'interagir sélectivement avec des protéines d'échafaudage et de signalisation, ce qui détermine le trafic cellulaire du récepteur, sa localisation à la membrane, et influence son niveau d'activation (Paoletti, Bellone et al. 2013). Les propriétés biophysiques et pharmacologiques des récepteurs NMDA dépendent en grande partie de leur composition en sous-unités GluN2. Ainsi, l'affinité des récepteurs pour le glutamate varie en fonction des sous-unités GluN2 présentes. L'assemblage GluN1/GluN2B est plus affin que les récepteurs GluN1/GluN2A ou ceux qui expriment GluN2C ou GluN2D. De plus, les cinétiques de désactivation du récepteur qui correspondent à la réduction du courant ionique entrant dans le canal, s'échelonnent

progressivement des plus rapides aux plus lentes, respectivement de GluN2A, GluN2B, GluN2C à GluN2D (Paoletti, Bellone et al. 2013). On peut déterminer l'implication des différentes sous-unités GluN2 dans l'activation des NMDAR grâce à des outils précieux que sont les antagonistes spécifiques. Par exemple, l'ifenprodyl reconnaît de manière préférentielle (100 fois supérieure) les NMDAR qui expriment la sous-unité GluN2B (NMDAR2B) et bloque leur activité en se fixant sur leur domaine N terminal (Williams, Russell et al. 1993; Mony, Krzaczkowski et al. 2009). En revanche, l'inhibition pharmacologique des récepteurs exprimant GluN2A (NMDAR2A) s'est révélée plus ardue car la sélectivité du blocage de ces récepteurs induite par un nouvel antagoniste, le NVP-AAM-077, a été remise en question. Il s'avère que le blocage préférentiel des NMDAR2A par ce composé, initialement montré comme 100 fois supérieur à l'inhibition des NMDAR2B, ne s'est révélé être que 10 fois supérieur (Neyton and Paoletti 2006). Il est à noter que certains récepteurs NMDA associent à GluN1 deux sous-unités GluN2 différentes, comme par exemple GluN2A et GluN2B. Ils sont qualifiés d'hétéro-trimériques (ex : NMDAR2AB) et leurs propriétés biophysiques et pharmacologiques sont intermédiaires (Rauner and Kohr 2011). Les NMDAR2AB sont exprimés fortement dans l'hippocampe au stade adulte où ils représentent alors le tiers du pool de récepteurs NMDAR (Rauner and Kohr 2011).



**Figure 9: Localisation des récepteurs au NMDA au cours du développement.** **A)** Coupe sagittale d'un cerveau de souris C57Bl6 avec les différentes structures (coloration AchE) **B)** Coupe sagittale d'un cerveau de souris C57bl6 avec les différentes structures (coloration de Nissl) **C, D et E)** Expression de NMDAR2A et NMDAR2B chez la souris du stade P0 à l'adulte. A la naissance, les récepteurs NMDAR2B sont majoritaires dans la plupart des régions du cerveau (**C**). De P0 à P14 (**D**), l'expression de NMDAR2A devient de plus en plus importante pour devenir majoritaire à l'âge adulte (**E**). La taille des récepteurs indique leur niveau relatif d'expression dans les différentes structures (inspiré de Paoletti et al, 2013)

## 2. Expression spatiotemporelle des NMDARs

Si la sous-unité obligatoire GluN1 est exprimée de manière ubiquitaire dans le SNC dès les stades précoces du développement, l'expression spatiotemporelle des sous-unités GluN2 varie selon la sous-unité considérée, comme en témoigne nombre d'études qui s'appuient sur des données électrophysiologiques et d'hybridation *in situ*. Les sous-unités GluN2B et GluN2D sont exprimées précocement dans la moelle épinière, le diencephale (GluN2B) et le mésencéphale (GluN2D), dès le stade embryonnaire 14 jours (E14), et leur expression augmente au cours du temps pour s'étendre à d'autres structures du SNC (Monyer, Burnashev et al. 1994). GluN2B apparaît ensuite dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet mais l'expression de GluN2D reste prépondérante dans la moelle épinière et le tronc cérébral (Monyer, Burnashev et al. 1994). Les sous-unités GluN2A et GluN2C, quant à elles, commencent à apparaître progressivement après la naissance et se répartissent selon un patron d'expression spécifique pendant la 1<sup>ère</sup> semaine de vie postnatale. On observe ainsi la présence de GluN2A dans l'hippocampe, le cortex et le cervelet, comme GluN2B, alors que GluN2C se concentre dans les noyaux thalamiques et le Cervelet (Monyer, Burnashev et al. 1994). Un changement de sous-unité peut se produire au sein d'une même structure, comme par exemple pour le Cervelet où GluN2B exprimé plus précocement est progressivement remplacé par GluN2A et GluN2C (Monyer, Burnashev et al. 1994). Cette disparition de GluN2B dans le cervelet accompagne la diminution globale de l'expression de cette sous-unité après la deuxième semaine postnatale (Wenzel, Fritschy et al. 1997). Ainsi, au stade adulte, GluN2B reste principalement confinée à l'hippocampe et au Cortex, GluN2C au cervelet, et GluN2D devient quasiment indétectable. Seules les sous-unités GluN1 et GluN2A conserve une expression régionale étendue (Monyer, Burnashev et al. 1994) (Figure 9).

Dans l'hippocampe, structure à laquelle je me suis plus particulièrement intéressé lors de ma thèse deux sous types de sous-unité GluN2 régulent la mise en place des réseaux neuronaux au cours du développement: GluN2A et GluN2B. Comme je l'ai évoqué précédemment, GluN2B est exprimée très tôt chez la souris (dès E14) et reste la sous-unité GluN2 majoritaire dans l'hippocampe jusqu'au 15<sup>ème</sup> jour après la naissance (Monyer, Burnashev et al. 1994; Sans, Petralia et al. 2000). La sous-unité GluN2A commence à apparaître à la naissance et son expression augmente pour devenir majoritaire à la troisième semaine post-natale (Figure 9). La composition synaptique en NMDAR change alors progressivement dans l'hippocampe et



les récepteurs NMDAR2A deviennent prépondérants (Groc, Heine et al. 2006). Ainsi, à l'âge adulte, plusieurs travaux indiquent que les récepteurs NMDAR2A ont principalement une localisation synaptique et les récepteurs NMDAR2B une localisation extra-synaptiques (Kohr 2006; Papouin, Ladepeche et al. 2012). Cependant, le fait que la localisation synaptique ou extra-synaptique des NMDAR détermine leur composition en sous-unités (GluN2A ou GluN2B) reste sujet à controverse (Harris and Pettit 2007). Il est d'autant plus difficile d'appréhender la composition des NMDAR dans un compartiment particulier que ces récepteurs ont capacité de diffuser dans la membrane avec des propriétés de diffusion qui dépendent de la nature de la sous-unité (Groc, Heine et al. 2006). Cette hypothèse d'un lien entre composition en sous-unité et localisation synaptique est néanmoins confortée par les études montrant que le domaine C-terminal des sous-unités GluN2 régule l'interaction des NMDAR avec les protéines intracellulaires d'échafaudage synaptiques (MAGUK) (Sans, Prybylowski et al. 2003). Chaque sous-unité possède une affinité de liaison particulière pour les protéines MAGUK ; ainsi l'affinité de GluN2A pour PSD95 est plus importante que celle de GluN2B (Prybylowski and Wenthold 2004). Comme nous l'avons évoqué précédemment cette interaction GluN2-MAGUK influence le trafic et l'ancrage des récepteurs à la synapse. Ceci a été montré élégamment par des expériences de mutation ciblée des sous-unités GluN2A et B qui altèrent le site de liaison aux protéines à domaine PDZ dans le domaine C terminal (Cousins and Stephenson 2012). Ce type de mutation entraîne une diminution sensible de l'expression synaptique des récepteurs recombinants. Comprendre les mécanismes qui régulent l'expression synaptique des NMDAR nous amène à nous interroger sur les étapes de la mise en place des synapses et la contribution des NMDAR dans ce processus.

### 3. Rôle des interactions protéiques dans la régulation des NMDARs

#### a) Mise en place et maturation des synapses glutamatergiques

La mise en place des synapses excitatrices comme leur stabilisation au cours des processus de plasticité, est un processus complexe qui est essentiel au bon fonctionnement du système nerveux. Les problèmes liés à la formation des synapses se traduisent en général par des déficits d'apprentissage et de mémoire chez l'adulte, ou des pathologies neuro-développementale avérées telles que l'autisme, la schizophrénie, ou encore la dépression (Lau

and Zukin 2007). Ce processus de mise en place se déroule en plusieurs étapes successives qui sont initiées en général aux contacts établis entre les axones et les dendrites des neurones. On distingue plusieurs scénarii possibles pour rendre compte des premières étapes (McAllister 2007). Les vésicules pré-synaptiques peuvent s'accumuler en un point focal de l'axone suivi par un recrutement de protéines MAGUK et de récepteurs glutamatergiques (initialement les NMDAR puis les AMPAR) (Washbourne, Bennett et al. 2002). Il est également possible d'observer dans la dendrite l'organisation initiale d'une structure regroupant des protéines d'échafaudage et des molécules d'adhésion comme la neuroligine, qui stabilise l'ancrage des MAGUK à la membrane (Washbourne, Dityatev et al. 2004; McAllister 2007). Après la stabilisation de cette structure post-synaptique, l'élément pré-synaptique se forme en regard et un ensemble de protéines pré et post-synaptiques est spécifiquement adressé aux deux côtés de la synapse pour compléter sa maturation (McAllister 2007). Ces étapes dépendent de manière critique de la dynamique du cytosquelette d'Actine et de l'activation en aval de kinases et de phosphatases qui régulent en retour le trafic des récepteurs glutamatergiques NMDAR et AMPAR et l'expression de gènes clefs. Enfin l'environnement extracellulaire de la synapse et en particulier la matrice extracellulaire joue également un rôle déterminant.

#### b) Les protéines d'adhésion transmembranaires

Nous avons vu (paragraphe IV-3-c) que les protéines d'adhésion, comme le complexe Neurexine/Neuroligine/LRRTM2, jouaient un rôle important dans la régulation du trafic des protéines post-synaptiques comme les NMDAR, les AMPAR ou la PSD95 (de Wit, Sylwestrak et al. 2009; Ko, Zhang et al. 2009). Leur rôle ne se limite pas à ces processus puisqu'une étude récente a révélé l'implication de la Neuroligine 1 (Nlg1) dans la mise en place des synapses (Barrow, Constable et al. 2009). Nlg1 est exprimée dans les dendrites avant la formation des synapses et se concentre rapidement au niveau des sites de contact axono-dendritiques. Cet adressage sélectif de Nlg1 au point de contact favorise le recrutement de la PSD95 et ralentit la diffusion des récepteurs NMDA dans la membrane plasmique (Barrow, Constable et al. 2009). Selon ces auteurs, la Nlg1 permet de stabiliser les NMDAR à la membrane post-synaptique en privilégiant les interactions entre récepteurs et MAGUKs. Cependant, la rétention synaptique des NMDAR pourrait être indépendante des MAGUKs et impliquer d'autres interactions. En effet, des interactions extracellulaires se produisent entre le domaine

Cholinesterase de la Nlg1 et la partie N-terminale de la sous-unité GluN1 des NMDAR (Budreck, Kwon et al. 2013). Il résulte de ces interactions un contrôle direct exercé par la Nlg1 sur l'expression synaptique des NMDAR. L'activation de la Nlg1 requiert la fixation de son ligand pré-synaptique, la Neurexine. Or les protéines LRRTM sont également des partenaires trans-synaptiques de la Neurexine qui stimulent la différenciation des éléments pré et post-synaptiques et donc la formation des synapses excitatrices (de Wit, Sylwestrak et al. 2009; Ko, Zhang et al. 2009). Ces études démontrent donc le rôle primordial des protéines trans-synaptique dans la mise en place et la différenciation des synapses excitatrices.

### c) La matrice extracellulaire

Récemment, plusieurs travaux ont montré l'importance du microenvironnement dans la mise en place des synapses (Dityatev and Schachner 2006). La matrice extracellulaire (MEC) est organisée en réseaux complexes qui peuvent ralentir la diffusion de composés solubles comme les facteurs de croissance ou les neurotransmetteurs et perturber ainsi la transmission du message nerveux. Certains composés sont produits par les cellules gliales ou les neurones et s'accumulent dans la MEC. Ainsi on distingue par exemple le complexe des Pentraxines Neuronales 1 et 2 dont un des membres (Narp ou Pentraxine 2) est exprimé dans les synapses excitatrices et forme un assemblage avec les sous-unités des récepteurs AMPA (O'Brien, Xu et al. 2002). Cette association permet de favoriser le regroupement des récepteurs AMPA post-synaptiques sous la forme de « cluster ». D'autres glycoprotéines de la matrice comme la Reeline, connue pour son rôle dans la migration neuronale au cours du développement embryonnaire, sont impliquées dans la maturation des synapses excitatrices (Barros, Franco et al. 2011). La Reeline est un ligand du récepteur 2 de l'Apolipoprotéine E et des récepteurs des VLDL (Very Low-Density Lipoprotein) qui contribue à activer les kinases de la famille des Src kinases et à phosphoryler la molécule adaptatrice dab1 (Disabled 1), (Hiesberger, Trommsdorff et al. 1999). Ses effets vont cibler le pool des récepteurs au glutamate synaptiques car elle augmente la réponse synaptique des récepteurs AMPA et favorise le remplacement des NMDAR2B par les NMDAR2A à la synapse (Qiu and Weeber 2007). Cette régulation de la composition des NMDAR synaptiques par la Reeline met en jeu un contrôle de la diffusion des NMDAR2B dans la membrane plasmique qui dépend de l'Intégrine  $\beta 1$  (Groc, Choquet et al. 2007). Ainsi, la maturation de la synapse glutamatergique et en particulier



l'expression synaptique des récepteurs au glutamate sont fortement perturbées chez des souris mutantes *Reeler*, qui sont dépourvues de *Reeline*. Dans ce modèle, l'expression synaptique des récepteurs NMDA et AMPA est altérée, ce qui se traduit par une baisse de l'amplitude des réponses synaptiques de type AMPA. Ce dysfonctionnement de la synapse glutamatergique en l'absence de *Reeline* est confirmé par d'autres études montrant un développement anormal des épines dendritiques et une perturbation de la plasticité synaptique dans un contexte appauvri en *Reeline* (Iafrati, Orejarena et al. 2013).

#### d) Les protéines post-synaptiques

Les protéines post-synaptiques jouent un rôle très important dans la mise en place des synapses, notamment par leur interaction avec les récepteurs. Nous avons vu précédemment que la protéine d'échafaudage PSD95 était adressée rapidement aux contacts axono-dendritiques via Ngl1 pour initier la formation des synapses excitatrices (Barrow, Constable et al. 2009). Lors de ce processus d'adressage Ngl1 interagit avec le domaine PDZ3 de PSD95. Ce sont d'autres interactions, en particulier avec les domaines PDZ1 et PDZ2 de la PSD95, qui contrôlent le recrutement synaptique des récepteurs NMDA et des canaux potassiques (Irie, Hata et al. 1997). Mais les protéines d'adhésion recrutent également des protéines kinases telles que la sérine kinase CASK (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase) appartenant aux protéines MAGUKs (Chao, Hong et al. 2008). L'état de phosphorylation de CASK est essentiel à son recrutement synaptique car c'est sa forme phosphorylée par la kinase Cdk5 qui est adressée aux synapses (Samuels, Hsueh et al. 2007). CASK joue un rôle essentiel dans la synaptogenèse et la mise en place des réseaux neuronaux car son absence entraîne la mort des fœtus in utero (Atasoy, Schoch et al. 2007). De plus, la délétion de CASK dans des cultures de neurones d'Hippocampe induit une diminution du nombre de synapse et d'épines (Chao, Hong et al. 2008). Des expériences complémentaires de gain de fonction ont révélé que l'état de SUMOylation de CASK contrôle sa capacité d'interagir via son domaine PDZ avec des protéines d'adhésion transmembranaires et de stabiliser la morphologie des épines (Chao, Hong et al. 2008). D'autres travaux ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui déterminent la fonction régulatrice de CASK dans l'agencement synaptique des récepteurs glutamatergiques. CASK est capable de réguler la fonction d'une autre protéine d'échafaudage MAGUK impliquée dans la formation des synapses : SAP97 (Synapse-

Associated Protein 97). C'est l'interaction de CASK avec SPA97 via leur domaine d'interaction protéine-protéine L27 qui provoque un changement de conformation spatiale de SAP97 et modifie son affinité pour deux types de récepteurs au glutamate. Ainsi, la forme compacte de SAP97, non liée à CASK, interagit préférentiellement avec la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPA alors que sa forme étendue s'associe préférentiellement avec la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA (Lin, Jeyifous et al. 2013). Ces travaux mettent lumière la régulation fine qu'exerce le couple CASK-SAP97 dans le trafic différentiel des récepteurs AMPAR et NMDAR. D'autres protéines MAGUK s'associent plus spécifiquement avec les NMDAR2B, comme SAP102 (Synapse-Associated Protein 102), qui forme un complexe avec ces récepteurs via son extrémité N-terminale. Des expériences de gain et de perte de fonction ciblant cette partie N-terminale de SAP102 ont permis de montrer que ce domaine favorise l'allongement des épines qui dépend de l'activité des récepteurs NMDA (Chen, Thomas et al. 2011).

#### e) Contribution des NMDAR2B

Le point commun entre ces différentes protéines est qu'elles contrôlent le trafic des récepteurs NMDA et leur recrutement synaptique, ce qui favorise également un remodelage morphologique des épines. Ceci souligne le rôle central des récepteurs NMDA dans la mise en place des épines et des synapses. Nous avons vu que, la sous-unité GluN2B est la première à être exprimée dans l'hippocampe au cours du développement, ce qui explique son rôle primordial dans la mise en place des synapses et des réseaux neuronaux (Sans, Petralia et al. 2000). En effet, la perte d'expression de GluN2B dans l'hippocampe provoque une désorganisation des synapses, en altérant la formation des réseaux d'Actine dans les épines et en diminuant conjointement l'expression synaptique de GluN1, GluN2A et PSD95 (Akashi, Kakizaki et al. 2009). Cet impact de la sous-unité GluN2B n'est pas propre à l'hippocampe mais est observé pour l'ensemble des synapses glutamatergiques du système nerveux central (Liu, Murray et al. 2004). Ainsi, des études sur les neurones corticaux ont montré que le remplacement par manipulation génétique de GluN2B par GluN2A au cours du développement perturbe localement la synthèse protéique et la régulation de la fonction des récepteurs AMPA aux synapses (Wang, Held et al. 2011). Ceci se traduit par une modification de certaines formes de plasticité synaptique et une altération profonde du comportement d'exploration des souris mutantes. Ce rôle capital de la sous-unité GluN2B est étroitement lié

à son interaction avec la CaMKII et à l'activation de la voie mTOR (Wang, Held et al. 2011). Ces travaux mettent en exergue l'importance du rôle initial des NMDA2B pour assurer un bon fonctionnement des réseaux neuronaux. Cependant, il est maintenant avéré que le changement de la composition des NMDAR synaptiques, d'un stade immature où les NMDA2B sont prépondérants à un stade mature où les NMDA2A sont majoritaires, est indispensable à la maturation de la synapse (Tovar and Westbrook 1999). Ce changement de sous-unité est sous le contrôle de REST, un répresseur de transcription qui limite la production de GluN2B pendant une période critique du développement. Le blocage de REST *in vivo* bloque la maturation des synapses en perturbant le changement de composition des NMDAR synaptiques et en altérant l'acquisition de propriétés caractéristiques des NMDAR matures (Rodenas-Ruano, Chavez et al. 2012). Cette activation de REST dans les neurones hippocampiques pendant la période critique dépend de l'environnement, car l'isolement des souriceaux loin de leur mère l'inhibe et prévient l'acquisition d'un phénotype synaptique mature (Rodenas-Ruano, Chavez et al. 2012). Enfin, la maturation des synapses dépend également de la sous-unité GluN3A dont l'expression doit être réprimée pour permettre l'émergence d'une organisation synaptique mature et l'expression des processus de plasticité synaptique (Roberts, Diez-Garcia et al. 2009).

La mise en place des synapses donne lieu à une organisation spatiotemporelle adéquate des protéines de structure et des récepteurs qui va déterminer le bon fonctionnement synaptique et l'expression des processus de plasticité. Les différentes formes de plasticité synaptique, qui incluent la LTP et la LTD, dépendent en effet de la bonne régulation du trafic des récepteurs (à la synapse ou en dehors de la synapse), de la phosphorylation des sous-unités et/ou de leurs partenaires et du remodelage de l'Actine au niveau des épines. Ces différents processus représentent la base cellulaire et moléculaire du renforcement synaptique et de la consolidation de la mémoire.

## VI. Rôle des NMDAR dans la transmission et la plasticité synaptique

### 1. NMDAR et transmission synaptique

Deux types de récepteurs-canaux au glutamate participent à la transmission synaptique excitatrice, les récepteurs AMPA et NMDA, qui ont des cinétiques d'activation très différentes. Les NMDAR s'activent plus lentement que les récepteurs AMPA et cette cinétique d'activation leur permet d'être de véritables détecteurs de coïncidence entre l'activation de l'élément pré-synaptique et la dépolarisation de l'élément post-synaptique (Harsch and Robinson 2000). L'efficacité de cette transmission synaptique peut être augmentée dans les processus de plasticité comme la potentialisation à long terme (ou LTP) ou diminuée, dans la dépression à long terme (ou LTD). La LTP, véritable base cellulaire de la mémoire, est la forme de plasticité synaptique la plus étudiée dans l'hippocampe (Lynch 2004).

Au potentiel de repos des neurones, le pore des récepteurs NMDAR2A et 2B est bloqué par des ions magnésium (les autres sous-unités présentent une plus faible sensibilité au  $Mg^{2+}$ ) et la conductance du courant généré par ces récepteurs est donc très faible (Perez-Otano and Ehlers 2004). Le blocage peut être levé par l'activation d'autres récepteurs comme par exemple les AMPAR post-synaptiques qui contribuent à dépolariser la membrane, et par l'arrivée des potentiels d'action au niveau pré-synaptique. Les NMDAR deviennent alors actifs en présence de leur agoniste (glutamate ou NMDA) et co-agoniste (glycine ou D-Sérine), et laissent entrer des cations  $Na^+$ ,  $K^+$  et  $Ca^{2+}$  de l'espace extracellulaire vers le compartiment intracellulaire. La fixation du co-agoniste sur les NMDAR contribue à augmenter leur activation de 50 à 100 fois lorsqu'il s'agit de la glycine (Nong, Huang et al. 2004). L'activation des NMDAR par leur co-agoniste, la glycine ou la D-Sérine, peut exercer différents effets selon qu'elle est associée ou non à une activation conjointe par le glutamate. La fixation préalable de la glycine ou de la D-Sérine n'active pas de courants ioniques mais provoque une internalisation du récepteur après son activation en présence de glutamate (Nong, Huang et al. 2004). L'effet classique de ces co-agonistes requièrent une activation simultanée par le glutamate et augmente la probabilité d'ouverture du canal NMDA (Gating). Ainsi, la Glycine et la D-Sérine sont capables de réguler la présence des NMDAR potentiellement actifs à la membrane en favorisant leur internalisation après une phase d'activation (Nong, Huang et al. 2003; Nong, Huang et al. 2004). Récemment, l'équipe de Stéphane Ollier a montré un rôle différentiel de

la D-Sérine et de la Glycine dans l'activation des récepteurs NMDA et la régulation des processus de plasticité post-synaptique (Papouin, Ladepeche et al. 2012). Selon ces auteurs, l'activation des NMDAR synaptiques dans l'hippocampe adulte requiert exclusivement une co-activation par la D-Sérine. En effet, l'action des transporteurs spécifiques permet de limiter la présence de la glycine dans la fente synaptique de telle sorte que la D-Sérine active préférentiellement les NMDAR synaptiques la Glycine les NMDAR extra-synaptiques (Papouin, Ladepeche et al. 2012).

## 2. Régulation du trafic des NMDAR

### a) Export du réticulum et adressage à la membrane

Le trafic des récepteurs NMDA à la membrane plasmique des neurones est finement régulé et se déroule en plusieurs étapes. Initialement, les sous-unités sont traduites séparément, puis assemblées dans le réticulum endoplasmique et c'est l'association de sous-unités en complexes GluN1/GluN2 ou GluN1/GluN3 qui est adressée à la membrane plasmique. Seuls ces complexes sont exportés car les monomères de GluN1 ou GluN2 sont retenus dans le réticulum endoplasmique (Hawkins, Prybylowski et al. 2004; Horak, Chang et al. 2008). La délétion par mutagenèse dirigée de différents domaines dans la partie C terminale de GluN1 (C0, C1, C2 et C2') a permis d'identifier les sites responsables de sa rétention dans le réticulum endoplasmique (Horak and Wenthold 2009). Ainsi, deux séquences indépendantes ont été caractérisées dans la cassette C1 de GluN1, KKK et RXR (Standley, Roche et al. 2000), et la mutation combinée de ces deux sites est requise pour permettre l'adressage de GluN1 à la membrane plasmique dans des cellules hétérologues (Horak and Wenthold 2009). A proximité de ces sites, on distingue des sites de phosphorylation pour la PKC (Protéine Kinase C, S890 et 896) et la PKA (Protéine Kinase A, S897) qui sont également impliqués dans l'adressage des récepteurs à la membrane (Scott, Blanpied et al. 2003). L'activation de la PKC par le Phorbol-12-Myristate-13-Acetate ou de la PKA par la Forskolin favorise en effet l'expression en surface des sous-unités GluN1 dans des systèmes de surexpression (Scott, Blanpied et al. 2001). Cependant des expériences de mutagenèse dirigée ciblant ces sites de phosphorylation démontrent que leur phosphorylation ne permet pas à elle seule d'initier l'export de GluN1 du Réticulum Endoplasmique vers la membrane (Horak and Wenthold 2009). D'autres sites

ont depuis lors été caractérisés, mais ils existent des différences substantielles selon les isoformes de GluN1. Ainsi, les cassettes, C2 (isoforme GluN1-1a) ou C2' (isoformes GluN1-3a ou GluN1-4a) déterminent la capacité de ces isoformes à être adressées en surface. La cassette C2' avec son motif de liaison au domaine PDZ facilite l'export des isoformes GluN1-3a ou 4a hors du réticulum endoplasmique (Scott, Blanpied et al. 2001). Ces différentes études soulignent l'importance de la sous-unité GluN1 dans la régulation des étapes initiales du trafic des NMDAR, l'export du réticulum endoplasmique. Depuis lors, d'autres séquences de rétention ont été observées dans chaque sous-unité GluN2 (Hawkins, Prybylowski et al. 2004; Yang, Zheng et al. 2007). Lorsque les sous-unités GluN1 et GluN2 sont assemblées dans le réticulum, ces séquences de rétention se masquent mutuellement, ce qui permet l'adressage des hétéromères GluN1/GluN2 à la membrane plasmique (Horak, Chang et al. 2008).

#### b) Internalisation et ancrage synaptique

La régulation du maintien en surface des NMDAR est principalement sous le contrôle de la sous-unité GluN2. GluN2A et GluN2B possèdent différentes séquences régulatrices de l'endocytose dans leur partie C-terminale (Lavezzari, McCallum et al. 2004) comme le domaine dileucine (LL) situé en 1319-1320 de la sous-unité GluN2A, qui régule l'internalisation des NMDAR2A. Ce domaine est capable d'interagir avec la sous-unité  $\mu$ 1 de la protéine adaptatrice AP2 qui est impliquée dans l'internalisation dépendante de la Clathrine. Un autre domaine de la sous-unité GluN2B régule le comportement des récepteurs NMDAR2B à la membrane plasmique. Il s'agit du domaine YEKL qui interagit principalement avec la sous-unité  $\mu$ 2 de l'adaptateur AP2 et détermine l'internalisation des NMDAR2B (Roche, Standley et al. 2001). La tyrosine Y1472 de ce domaine peut être phosphorylée par les kinases de la famille SRC, et notamment la kinase Fyn. Cette phosphorylation facilite deux processus intimement reliés : d'une part elle diminue l'affinité de l'adaptateur AP2 pour la séquence régulatrice YEKL et prévient l'internalisation des NMDAR ; d'autre part elle permet de recruter une protéine à domaine PDZ, la PSD-95, qui se lie au domaine ESDV de la sous-unité GluN2B et facilite l'ancrage des NMDAR à la synapse (Prybylowski, Chang et al. 2005). L'internalisation des NMDAR dépend également de leur activité car elle est induite par des stimulations répétées. Ce processus d'internalisation activité-dépendante requiert la déphosphorylation conjointe des tyrosines intracellulaires 837 de la sous-unité GluN1 et 842 de la sous-unité GluN2A

(Vissel, Krupp et al. 2001). Une fois internalisés, le devenir des NMDAR dépend de leur composition en sous-unité GluN2. Ainsi, la présence de GluN2B détermine leur trafic dans les endosomes de recyclage identifiés par le marqueur Rab11 alors que les NMDAR2A sont orientés vers les voies de dégradation (Nong, Huang et al. 2004).

D'autres partenaires des récepteurs NMDA favorise leur stabilisation dans la densité post-synaptique comme la  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-dependent Kinase de type II (CaMKII). L'activation de la CaMKII est induite par l'augmentation intracellulaire des niveaux de Calcium via sa phosphorylation sur son résidu thréonine 286 (pCaMKII-T286). Plus précisément, l'activation de la CaMKII est dépendante de l'activité des récepteurs NMDA (Strack and Colbran 1998). L'activation de la CaMKII permet d'induire l'activation de multiple de voie de signalisation intracellulaires comme la voie ERK (El Gaamouch, Buisson et al. 2012). Cependant l'activation de la CaMKII par la phosphorylation de T286 ne semble pas nécessaire au bon fonctionnement de la synapse (Grey and Burrell 2010; Pi, Otmakhov et al. 2010). Une fois activée, cette kinase s'associe au NMDAR2B à la densité post-synaptique (Raveendran, Devi Suma Priya et al. 2009; Sanhueza, Fernandez-Villalobos et al. 2011; Yan, Xu et al. 2011) et ce complexe récepteur-kinase permet de prolonger l'activation de la CaMKII par suppression de son auto-inhibition (Bayer, De Koninck et al. 2001). En effet, la cinétique d'inactivation de la CaMKII est rapide et requiert la phosphorylation de deux autres résidus thréonine, la thréonine 305 et la thréonine 306 (pCaMKII-T305-306) (Colbran 1993). L'augmentation de calcium au niveau post-synaptique permet également l'activation de la Calmoduline (CaM) qui vient alors interagir avec la sous unité GluN1. La liaison de la Calmoduline sur GluN1 diminue la fréquence d'ouverture du canal, et inactive les récepteurs NMDA (Hisatsune, Umemori et al. 1997). La CaMKII et la CaM entre donc en compétition lors de l'entrée de calcium au niveau post-synaptique afin de réguler l'activité des récepteurs NMDA et dans la régulation des processus de plasticité. La Calmoduline peut se fixer à la CaMKII en l'inhibant (Ishida, Kitani et al. 1994). L'action de la CaMKII ne se limite pas à la formation de complexes CaMKII-NMDAR et joue un rôle essentiel dans la fonction de la synapse glutamatergique lors des processus de plasticité, via la régulation du trafic des récepteurs AMPA (voir ci-après).

### c) Diffusion latérale des NMDAR

De nouvelles approches technologiques comme le « single-particle tracking » ont permis l'analyse du trafic en temps réel de récepteurs entre les synapses et le compartiment extrasynaptique, et mis en évidence la dynamique de diffusion de surface des NMDAR initialement révélée par Tovar et Westbrook, 2002 (Tovar and Westbrook 2002; Groc, Heine et al. 2006). Les NMDARs entrent et sortent de la synapse par diffusion latérale dans la membrane et leur vitesse de diffusion ainsi que leur temps de résidence à la synapse dépend de leur sous-unité GluN2 (Groc, Heine et al. 2006). Ainsi les NMDAR2A sont plus stables que les NMDAR2B caractérisés par une capacité de diffusion rapide à la membrane (Groc, Heine et al. 2006). Les NMDARs hétéro-trimériques, GluN1-GluN2A-GluN2B ont quant à eux une mobilité membranaire intermédiaire (Groc, Heine et al. 2006). La stabilité des NMDARs dépend principalement de leur affinité pour les protéines d'échafaudage synaptiques (MAGUK) et de leur état de phosphorylation ou d'activation (Groc, Heine et al. 2006; Zhang, Edelman et al. 2008; Goebel-Goody, Davies et al. 2009). Le domaine C-terminal des sous-unités GluN2 dispose en effet de plusieurs sites de phosphorylation qui régulent leur ancrage à la synapse et leur fonction. Ainsi, GluN2B possède deux sites principaux, les tyrosines 1336 (Y1336) et 1472 (Y1472), qui déterminent la localisation synaptique ou extra-synaptique des NMDAR2B. Nous avons vu précédemment que Y1472 régule l'internalisation des NMDAR2B, mais ce site contrôle également leur localisation synaptique (Goebel-Goody, Davies et al. 2009). En revanche, Y1336 favorise une expression extra-synaptique de ces récepteurs (Goebel-Goody, Davies et al. 2009). Chaque phosphorylation est favorisée soit par l'activation de kinases de la famille des SFK (Src Family Kinases, pour Y1472) ou l'inhibition de la protéine phosphatase STEP concentrée dans le compartiment extra-synaptique (Striatal Enriched Protein Tyrosine Phosphatase, pour Y1336) (Goebel-Goody, Davies et al. 2009). D'autres effets des SFK sur la phosphorylation des NMDAR2A et la régulation de l'activité des NMDAR les placent en acteurs clés de la fonction des NMDAR synaptiques (Salter, Dong et al. 2009).





## VII. Bases cellulaires et moléculaires de la mémoire : Les différents processus de plasticité dans l'hippocampe

La question du substrat biologique de la mémoire reste un sujet d'actualité et nous nous intéresserons ici aux mécanismes cellulaires et moléculaires de la plasticité synaptique. Il s'agit de mécanismes qui favorisent la réorganisation synaptique et permettent de stabiliser ou non cette réorganisation à long terme. A ce jour, plusieurs processus de plasticité synaptiques ont été identifiés mais on distingue en particulier deux formes qui sont considérées comme une base cellulaire de la mémoire. Il s'agit de la potentialisation à long terme (LTP) et de la dépression à long terme (LTD). La LTP se définit par l'augmentation à long terme de la force synaptique entre deux neurones alors que la LTD correspond à la diminution à long terme de cette efficacité synaptique. Ces deux processus, bien qu'ils s'opposent, sont tous les deux induits par l'activité neuronale et participent à la mise en mémoire d'information ou à l'oubli de connaissances devenues inutiles ou obsolètes. La LTP et la LTD s'expriment dans l'hippocampe comme dans d'autres régions du cerveau (Kim and Linden 2007; Massey and Bashir 2007), mais je n'envisagerai ici que les travaux centrés sur l'hippocampe. Connues depuis les années 70 avec les études de Bliss et Lomo (LTP), ou Lynch (LTD) (Bliss and Lomo 1973), ces deux formes de plasticité synaptique affectent les synapses excitatrices de type glutamatergiques ou inhibitrices de type GABAergiques. Leur expression est régulée par les différents récepteurs au glutamate, mais aussi par d'importantes cascades de signalisation calcique post-synaptiques.

### 1. La potentialisation à long terme : la LTP

#### a) Généralités

La forme de plasticité la plus étudiée est la potentialisation à long terme dépendant des NMDAR dans la région CA1 de l'hippocampe. Elle se traduit par une augmentation prolongée de la réponse synaptique glutamatergique qui met en jeu les récepteurs NMDA post-synaptiques (Malenka and Bear 2004). Elle est induite par une stimulation à très haute

fréquence de l'élément pré-synaptique qui diminue son seuil d'excitabilité et facilite la libération vésiculaire du glutamate (Ganguly, Kiss et al. 2000). Elle requiert également l'activation des NMDAR post-synaptiques et des canaux calciques de type L (Zakharenko, Zablow et al. 2001). On distingue plusieurs formes de LTP avec chacune ses caractéristiques (Raymond 2007) : La LTP précoce (Early-LTP ; E-LTP), de courte durée, qui ne nécessite pas de synthèse protéique ; la LTP-2, ou intermédiaire, requiert quant à elle une synthèse protéique locale au niveau synaptique ; enfin la LTP tardive (Late-LTP ; L-LTP), forme persistant de plusieurs heures (in vitro) à plusieurs mois (in vivo), qui met en jeu une synthèse protéique par induction de gènes cibles. Ces trois formes de LTP se distinguent par leurs mécanismes d'induction et les voies de signalisation intracellulaires mises en jeu.

La LTP, comme la LTD, se déroule en deux phases bien distinctes : l'induction et l'expression. L'induction de la LTP correspond à l'ensemble des paramètres qui vont permettre à la synapse de maintenir une activité à long terme. L'expression de la LTP correspond aux modifications induites suite à l'induction de la LTP comprenant les différentes cascades de phosphorylation à l'induction de la transcription de gènes. Je vais détailler ici les éléments clefs de ces deux phases.

#### b) Induction

Les premières études ont montré que les antagonistes des récepteurs NMDA comme la PCP (Phencyclidine), la kétamine (Stringer and Guyenet 1983) ou l'AP-5 (Morris, Anderson et al. 1986) bloquent la LTP et perturbent l'apprentissage (Morris, Anderson et al. 1986; Davis, Butcher et al. 1992). On s'est aperçu que la pré-incubation avec du NMDA ou du glutamate permet de lever le blocage  $Mg^{2+}$  et d'induire la LTP (Kauer, Malenka et al. 1988) suggérant un rôle déterminant de la dépolarisation de l'élément post-synaptique dans cette phase d'induction (Malinow and Miller 1986).

L'élément pré-synaptique est un acteur clé dans l'induction de cette plasticité. En effet, la probabilité de libération pré-synaptique du neurotransmetteur est augmentée lors de la LTP (Bekkers and Stevens 1990). Ceci se traduit par une augmentation du nombre de vésicule libérées mais aussi par une libération de glutamate plus importante par vésicule (Kullmann and Nicoll 1992; Liao, Jones et al. 1992; Emptage, Reid et al. 2003). On observe ainsi une

diminution de la variabilité de la réponse synaptique et du nombre d'échecs de transmission (Malinow and Tsien 1990). Plusieurs types de récepteurs pré-synaptiques contribuent à moduler cette libération vésiculaire du neurotransmetteur comme les récepteurs Kainate (Schmitz, Mellor et al. 2003). D'autre part, l'activation post-synaptique exerce en retour un contrôle sur l'expression des récepteurs glutamatergiques de l'élément pré-synaptique pendant la LTP. La LTP provoque en effet une production d'ARNm codant pour le récepteur glutamatergique pré-synaptique GR33 qui dépend de l'activation des NMDAR post-synaptiques. Ces résultats suggèrent l'existence de mécanismes de régulation trans-synaptique de la LTP (Smirnova, Laroche et al. 1993).

La fonction des NMDAR post-synaptiques et l'influx calcique qu'ils génèrent sont indispensables pour l'induction de la LTP (Regehr and Tank 1990). Ainsi, l'injection dans l'hippocampe d'une sonde antisens ciblant la sous-unité GluN1 des NMDAR perturbe les stades précoces de la LTP (Matthies, Schroder et al. 1995). La contribution des sous-unités GluN2 dans cette phase d'induction varie selon le sous-type de récepteur considéré (Hrabetova, Serrano et al. 2000). L'absence de la sous-unité GluN2A réduit la LTP sans la bloquer totalement et altère les performances d'apprentissage spatial. Cette réduction de la LTP chez les souris mutantes suggère une contribution potentielle de la sous-unité GluN2B au processus de plasticité (Sakimura, Kutsuwada et al. 1995). Cependant, l'implication des NMDAR2B reste sujette à controverses. Si certaines études pharmacologiques révèlent que le blocage des NMDAR2B altère seulement la LTD (Liu, Wong et al. 2004), d'autres groupes montrent que ce blocage, par l'expression de GluN2B tronquée ou l'invalidation de GluN2B, prévient l'induction de la LTP hippocampique (Clayton, Mesches et al. 2002; Gardoni, Mauceri et al. 2009). De plus, l'altération de la LTP induite par l'absence de NMDAR2B n'est pas compensée par l'expression de récepteurs chimériques exprimant la partie C terminale de NMDAR2A (Weitlauf, Honse et al. 2005; Foster, McLaughlin et al. 2010). On peut conclure de l'ensemble de ces recherches que les deux types de récepteurs participent aux processus de LTP (Berberich, Punnakal et al. 2005). L'importance des NMDAR dans la mise en place de la LTP est également confirmée par les travaux montrant que l'absence du co-agoniste glycine, ou l'utilisation d'antagonistes spécifiques altèrent ce processus (Izumi, Clifford et al. 1990; Oliver, Larson et al. 1990). L'impact d'un blocage de l'activation de la glycine se traduit chez le rat par des troubles de l'apprentissage spatial (Watanabe, Himi et al. 1992). La glycine et la D

sérine sont libérées par les pieds astrocytaires qui englobent les synapses ou les neurones (Papouin, Ladepeche et al. 2012), en partie sous le contrôle du transporteur Asc-1 dont l'augmentation d'activité favorise l'induction de la LTP (Rosenberg, Artoul et al. 2013).

La signalisation calcique est elle aussi essentielle au bon déroulement des événements synaptiques allant de la simple transmission à la LTP (Dunwiddie and Lynch 1979). En effet l'entrée de calcium au niveau post-synaptique est suffisante pour induire la LTP (Malenka, Kauer et al. 1988) et sa chélation provoque le blocage de cette plasticité (Lynch, Larson et al. 1983). Le calcium peut également provenir des stocks intracellulaires, ce qui lui confère des rôles multiples aussi bien dans l'induction de la LTP que dans son expression à plus long terme (Teyler, Cavus et al. 1994; Schiegg, Gerstner et al. 1995).

D'autres récepteurs au glutamate peuvent être impliqués dans l'induction de la LTP dépendant ou non des NMDAR, comme les récepteurs métabotropiques, mGluR (Bashir, Bortolotto et al. 1993). Ainsi, mGluR1 est capable d'interagir avec les NMDAR de façon à favoriser l'activation de la PKC via la PLC et d'induire la LTP (Skeberdis, Lan et al. 2001). Dans CA1, mGluR5 est un acteur clé pour l'induction de la LTP et la formation de la mémoire spatiale (Lu, Jia et al. 1997). Contrairement aux NMDAR, qui requièrent une activation répétée pour induire la LTP, une activation unique des récepteurs métabotropiques post-synaptiques est suffisante (Bortolotto, Bashir et al. 1994). Enfin, les récepteurs GABA-B participent à ce processus de plasticité car la diminution de leur activité favorise la levée du blocage magnésium des NMDAR post-synaptiques (Mott and Lewis 1991).

### c) Expression et signalisation

Pendant la LTP, de nombreuses kinases sont activées et contribuent à réguler de manière spécifique chaque phase de la LTP. Une kinase en particulier joue un rôle central dans l'expression de la LTP, il s'agit de la CaMKII (Calcium-Calmodulin-dependent Protein Kinase II (Malinow, Madison et al. 1988). Le blocage de la CaMKII in vitro sur des tranches d'Hippocampe ou son invalidation chez les souris, altèrent spécifiquement l'induction et l'expression de la LTP dans CA1, sans perturber la simple transmission synaptique, et génèrent des troubles de l'apprentissage spatial (Ito, Hidaka et al. 1991; Silva, Paylor et al. 1992; Silva, Stevens et al. 1992; Cho, Giese et al. 1998). La CaMKII possède deux principaux sites de

phosphorylation qui régulent son activité : la thréonine 286 qui active la CaMKII et les thréonines 305/306 qui l'inactive. Ainsi, L'expression d'une forme tronquée de la CaMKII contenant le site activateur (1-290) est capable d'induire une LTP normale (Pettit, Perlman et al. 1994), comme l'apport de la CaMKII entière (Lledo, Hjelmstad et al. 1995). Au contraire, la mutation du site activateur (Thr 286) chez la souris bloque la LTP dépendant des NMDAR (Giese, Fedorov et al. 1998). Son site inhibiteur (Thr 305/306) quant à lui intervient dans l'expression de la LTD. On observe que la persistance de la forme phosphorylée Thr286 de la CaMKII 60 minutes après induction de la LTP est nécessaire à l'expression de la L-LTP (Lengyel, Voss et al. 2004). La CaMKII stimule en effet la synthèse protéique nécessaire à l'expression de la L-LTP par phosphorylation de CPEB (cytoplasmic polyadenylation element binding protein), un facteur de transcription localisé dans le cytoplasme (Atkins, Davare et al. 2005). L'impact de la CaMKII peut être très localisé et cibler l'épine activée avec un signal synapse-spécifique (Lee, Escobedo-Lozoya et al. 2009). On observe que l'interaction post-synaptique entre CaMKII et GluN2B qui favorise l'ancrage des récepteurs NMDAR2B à la synapse, facilite l'induction de la LTP et le maintien de la force synaptique (Sanhueza, Fernandez-Villalobos et al. 2011). La CaMKII est également un acteur du remodelage synaptique induit par la LTP. Son action régule également la fonction et l'adressage synaptique des récepteurs au glutamate de type AMPA pendant la LTP. En effet, la CaMKII phosphoryle le résidu sérine 831 de la sous-unité GluA1 et provoque une augmentation de la conductance du récepteur (Barria, Muller et al. 1997; Derkach, Barria et al. 1999). Elle facilite enfin l'expression synaptique des récepteurs AMPA via leur association avec les protéines aux domaines PDZ (Hayashi, Shi et al. 2000). Ces processus de plasticité s'accompagnent d'une réorganisation du cytosquelette et de l'architecture synaptique, via l'association de la CaMKII aux densités post-synaptiques (Elgersma, Fedorov et al. 2002). Les modifications morphologiques dépendantes de la CaMKII se traduisent par la formation de nouvelles épines (Jourdain, Fukunaga et al. 2003), leur stabilisation (Hill and Zito 2013) et l'élargissement des épines déjà existantes (Yamagata, Kobayashi et al. 2009). Mais l'effet de la CaMKII ne se limite pas à l'élément post-synaptique pendant la LTP. En effet, la CaMKII pré-synaptique induit la phosphorylation de la Synapsin-1, protéine du cytosquelette qui régule l'organisation des vésicules de libération (Nayak, Moore et al. 1996). La CaMKII joue donc un rôle central dans la LTP et son impact sur l'acquisition de apprentissage spatial est déterminant (Bach, Hawkins et al. 1995; Cho, Giese et al. 1998; Giese, Fedorov et al. 1998).

D'autres protéines kinases, comme par exemple la Protéine Kinase C, sont des acteurs importants des processus de LTP. L'apport de la PKC dans les cellules pyramidales de l'hippocampe permet d'abaisser le seuil d'excitation de l'élément post-synaptique et favorise ainsi l'expression de la LTP (Hu, Hvalby et al. 1987). La PKC intervient principalement dans la phase de maintien de la LTP (Lovinger and Routtenberg 1988) car son blocage perturbe l'expression à long terme de la LTP sans modifier la phase initiale (Lovinger, Wong et al. 1987; Reymann, Brodemann et al. 1988; Colley, Sheu et al. 1990). Cette altération de l'expression à long terme de la LTP après blocage de la PKC provient d'une perturbation de la signalisation calcique (Cheng, Rong et al. 1994). Il existe différentes isoformes de la PKC (Roisin, Leinekugel et al. 1997) qui sont regroupées en deux catégories : les PKC calcium-dépendantes, incluant les formes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , et les PKC calcium-indépendantes ou formes atypiques,  $\epsilon$ ,  $\lambda$  et  $\zeta$ . La mutation de la PKC $\gamma$  qui est enrichie dans les membranes synaptiques après un entraînement (Paratcha, Furman et al. 2000), diminue les capacités d'induction de la LTP et provoque un déficit modéré de l'apprentissage (Abeliovich, Paylor et al. 1993). On remarque que la forme atypique PKM $\zeta$ , joue essentiellement un rôle régulateur puisque son expression dépend de l'activité préalable des autres kinases impliquées dans la LTP (comme CaMKII, PI3K ou encore PKA) (Kelly, Crary et al. 2007). Son action est double car sa phosphorylation permet l'expression de la LTP alors que sa déphosphorylation est importante dans l'expression de la LTD (Hrabetova and Sacktor 1996). D'autres isoformes atypiques de la PKC, comme la PKC $\lambda$ , sont impliquées dans l'incorporation synaptique des récepteurs AMPA, via la phosphorylation de la serine 818 dans la partie C-terminale de la sous-unité GluA1 (Boehm, Kang et al. 2006; Ren, Yan et al. 2013). L'impact de la PKC dans les processus mnésiques est suggéré par une corrélation positive entre capacité d'apprentissage spatial et niveau d'expression de la kinase (Wehner, Sleight et al. 1990).

La Protéine Kinase A est une protéine kinase activée par l'augmentation des taux intracellulaires en AMP cyclique (AMPc) qui régule plusieurs facettes de la LTP. En effet, la PKA permet la régulation de RIM1a, protéine d'échafaudage impliquée dans la régulation de la libération pré-synaptique de neurotransmetteur lors des processus de LTP (Castillo, Schoch et al. 2002). Mais elle joue également un rôle important au niveau post-synaptique dans le maintien et l'expression de la LTP. La PKA est activée par la stimulation des NMDAR post-synaptiques (Roberson and Sweatt 1996) et réciproquement régule la perméabilité calcique

de ces récepteurs (Skeberdis, Chevalleyre et al. 2006). L'inhibition de la voie AMPc ou la mutation de la PKA entraînent des perturbations des phases précoces (Otmakhova, Otmakhov et al. 2000) et tardives (Matthies and Reymann 1993) de la LTP. La PKA intervient également dans la consolidation de la mémoire à long terme en régulant la synthèse protéique nécessaire à l'expression de la L-LTP (Abel, Nguyen et al. 1997; Huang and Kandel 2007; Huang and Kandel 2007). Son rôle dans la phase tardive de la LTP repose principalement sur l'augmentation de synthèse des récepteurs AMPA (Nayak, Zastrow et al. 1998). Ces effets à long terme de la PKA résulte de l'activation de voies de signalisation qui induisent la translocation de ERK au noyau et l'activation de CREB (Impey, Obrietan et al. 1998). La PKA participe donc au développement des phases tardives de la LTP et aux modifications morphologiques qui en résulte comme la mise en place de nouvelles synapses (Tominaga-Yoshino, Kondo et al. 2002). L'expression de la LTP est enfin régulée par les Src kinases qui contribuent à amplifier l'activité des NMDAR et la signalisation calcique qui en découle (Lu, Roder et al. 1998). L'expression in vivo de formes mutantes des Src kinases se traduit par un développement anormal de l'hippocampe, puis une altération de la LTP à l'âge adulte qui est associée à des troubles de l'apprentissage spatial (Grant, O'Dell et al. 1992).

#### d) Marqueurs

Les marqueurs de la plasticité synaptique sont multiples et apparaissent après l'induction de la LTP. Lors de l'induction de la LTP, l'entrée de calcium via les NMDAR active la CaMKII par autophosphorylation et provoque sa redistribution aux synapses excitatrices. Cet adressage synaptique de la CaMKII favorise la formation de complexes CaMKII-NMDAR2B qui prolongent l'activation de la kinase. Cette persistance de l'activité de la CaMKII facilite la phosphorylation des AMPAR et initie le recrutement de nouveaux récepteurs AMPA aux synapses potentialisées par la LTP (Oh, Derkach et al. 2006; Lu, Isozaki et al. 2010), via un processus d'exocytose dépendant du complexe SNARE (Ahmad, Polepalli et al. 2012). Pendant la LTP, les AMPAR sont adressés à la membrane au niveau extra-synaptique d'où ils diffusent passivement vers la synapse (Makino and Malinow 2009). Les AMPAR exprimant la sous-unité GluA1 sont concernés en priorité par ce processus de plasticité (Meng, Zhang et al. 2003). En effet, ce processus d'exocytose localisé est facilité par la phosphorylation de la serine 845 de GluA1 (Oh, Derkach et al. 2006), alors que l'augmentation de la conductance des AMPAR



synaptiques requiert la phosphorylation de la sérine 831 (Barria, Muller et al. 1997; Derkach, Barria et al. 1999). L'apport de ces récepteurs AMPA à la synapse provoque une dépolarisation plus importante de l'élément post-synaptique qui est encore amplifiée par leur phosphorylation. On constate que le recrutement synaptique de la CaMKII activée, l'insertion de nouveaux récepteurs AMPA à la synapse et leur phosphorylation sont de véritables marqueurs de la LTP.

L'expression de la LTP implique l'induction de gènes précoces qui sont également de bons marqueurs de la plasticité comme Zif268 (Wisden, Errington et al. 1990). La LTP se caractérise également par le passage de synapses dites silencieuses aux synapses fonctionnelles. Avant l'induction de la LTP, les synapses silencieuses sont dépourvues de récepteurs AMPA et expriment exclusivement des NMDAR post-synaptiques qui restent inactifs en raison du blocage  $Mg^{2+}$ . Comme nous l'avons évoqué plus haut, l'induction de la LTP favorise le recrutement synaptique des AMPAR, transformant ainsi ces synapses silencieuses en synapses fonctionnelles (Isaac, Nicoll et al. 1995; Kerchner and Nicoll 2008). Un processus équivalent est mis en jeu dans la maturation des synapses au cours du développement (Durand, Kovalchuk et al. 1996). Ce sont les sous-unités GluA1 des AMPAR qui participent à cette transition de l'état silencieux à l'état fonctionnel (Selcher, Xu et al. 2012). Ce changement d'état de la synapse serait à la base des processus d'apprentissage et serait altéré dans diverses pathologies (Kessels and Malinow 2009).

La LTP s'accompagne non seulement d'une évolution de la fonction des synapses mais aussi de transformations morphologiques qui sont caractérisées par une augmentation de l'épaisseur de la PSD et un élargissement des épines dendritiques (Buchs and Muller 1996). Les d'épines de type champignon augmentent alors en densité tandis que les épines courtes et tronquées ainsi que les filopodes se raréfient (Desmond and Levy 1986). La LTP permet de faire une sélection des épines dendritiques en stabilisant les épines impliquées dans les processus de plasticité, tout en favorisant la naissance de nouvelles épines à proximité des synapses activées (De Roo, Klausner et al. 2008). L'établissement et le maintien de ces nouvelles épines est sous le contrôle de l'activité conjointe des NMDAR et de la CaMKII (Hill and Zito 2013) qui favorisent l'émergence d'épine stables à partir des filopodes (Jourdain, Fukunaga et al. 2003). Cette transformation requiert un remodelage du cytosquelette d'Actine (Lin, Kramar et al. 2005) qui s'enrichit en Actine fibrillaire grâce à un blocage du processus de

dépolymérisation par les NMDAR (Fukazawa, Saitoh et al. 2003). L'élargissement des épines résulte d'une synthèse protéique locale facilitée par un enrichissement en polyribosomes à la base des épines (Ostroff, Fiala et al. 2002). Sur ces épines, la LTP favorise la formation de synapses perforées caractérisées par la présence de plusieurs sites post-synaptiques apposés à un même site pré-synaptique (Toni, Buchs et al. 1999). Elle augmente également le nombre de zones actives pré-synaptiques (Sato, Morimoto et al. 2000) avec un recrutement de nouvelles régions post-synaptiques (Bolshakov, Golan et al. 1997). Les astrocytes renforcent ensuite leur contact avec ces nouvelles synapses, ce qui assure un couplage métabolique entre les cellules gliales et les synapses neuronales (Wenzel, Lammert et al. 1991).

Il existe donc plusieurs marqueurs de la LTP qui permettent de détecter et d'identifier les synapses potentialisées. Au plan morphologique, la densité, la taille et la forme des épines sont des critères pertinents. L'activation et le recrutement synaptique de la CaMKII d'une part, ainsi que l'expression synaptique et l'état de phosphorylation des récepteurs AMPA d'autre part, sont de véritables marqueurs d'une efficacité synaptique renforcée (Figure 10). Enfin, au plan génétique, l'expression de gènes précoces comme Zif268 caractérise l'expression d'une L-LTP.

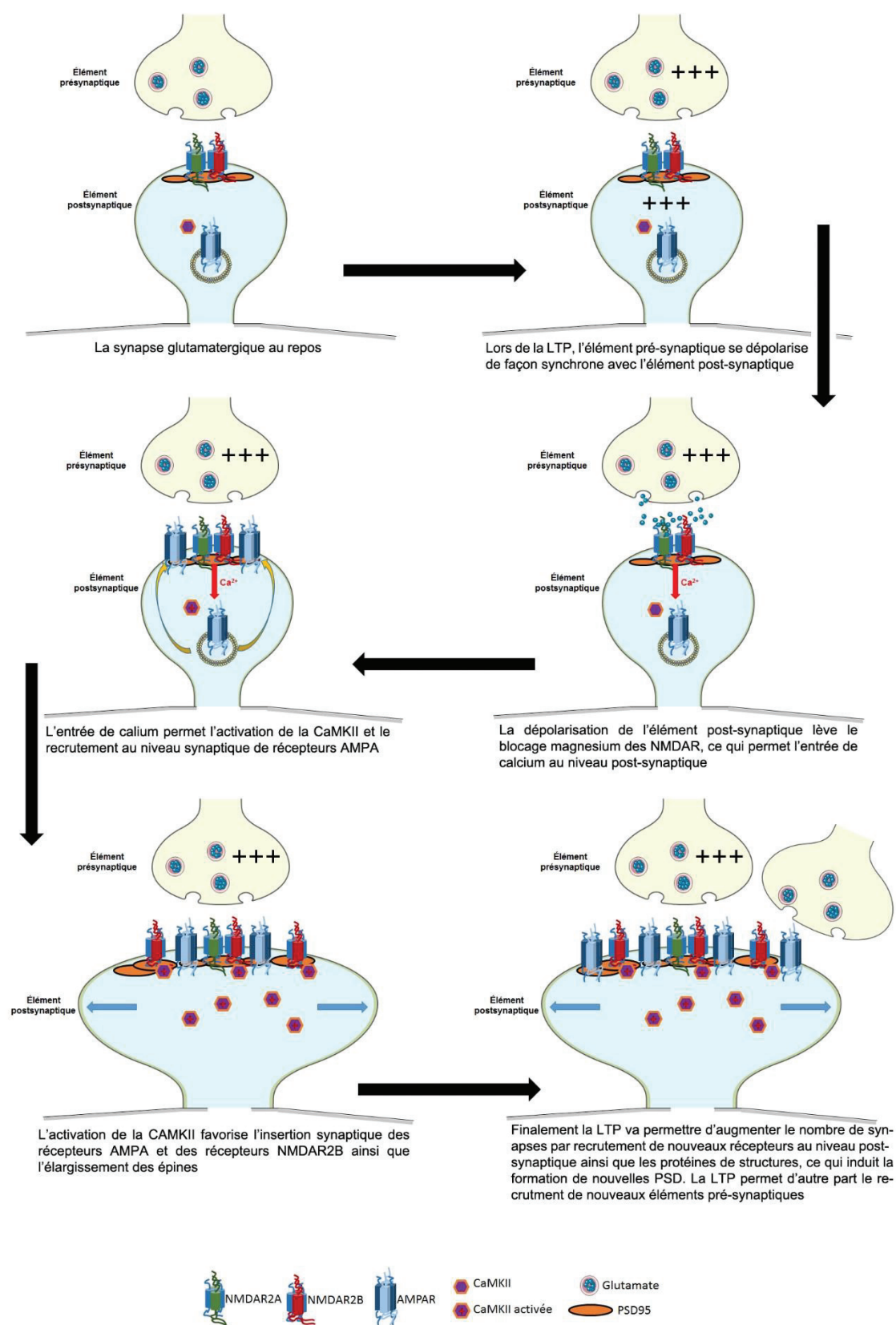
#### e) Modulateurs

Le microenvironnement synaptique régule de façon fine les processus de plasticité. En particulier, la neurotrophine BDNF, qui est exprimé dans de nombreuses régions du SNC, est un acteur clé de la LTP. Des expériences de gain ou de perte de fonction ont démontré le rôle déterminant du BDNF dans l'induction de la LTP dans l'hippocampe (Korte, Carroll et al. 1995; Korte, Griesbeck et al. 1996; Patterson, Abel et al. 1996). Le BDNF exerce une action à la fois sur les éléments pré et post-synaptiques, via son récepteur Trk-B et l'activation de la voie PLC $\gamma$  (Gartner, Polnau et al. 2006). De manière réciproque, il peut être libéré par ces deux sites (pré ou post-synaptique), sous le contrôle de la Synaptotagmine-IV, et exercer une régulation autocrine sur les mécanismes pré et post-synaptiques de la LTP (Dean, Liu et al. 2009). Le BDNF favorise enfin l'élargissement des épines et la synthèse protéique qui sont nécessaires à l'expression de la L-LTP (Tanaka, Horiike et al. 2008).

Le monoxyde d'azote (NO) est un autre régulateur de la LTP. Ce messager rétrograde est libéré dans le milieu extracellulaire après une activation des NMDAR post-synaptiques, et module l'activité pré-synaptique, (Zhuo, Small et al. 1993). Son impact sur la LTP dépend essentiellement de sa cinétique de libération par rapport à l'activation à haute fréquence du réseau et peut être négatif ou positif (Izumi, Clifford et al. 1992). Cet impact dépend des conditions de température et de l'âge, car dans les conditions physiologiques normales, le NO ne semble pas jouer de rôle particulier à l'âge adulte (Williams, Li et al. 1993). Au contraire, en condition défavorable (hypothermie) sur des tranches d'Hippocampe de jeune rat, l'inhibition de la NO synthase bloque l'induction de la LTP (Williams, Li et al. 1993). De plus, chez le rat en comportement, le blocage de cette enzyme provoque des troubles mnésiques (Bohme, Bon et al. 1993). Ces études suggèrent un rôle subtil du NO dans les processus de plasticité qui dépend du contexte. Ainsi, dans un contexte pathologique comme celui de l'ischémie, ce rôle pourrait être délétère via son action sur la plasticité synaptique (Costa, Tozzi et al. 2011).

Enfin, d'autres modulations plus générales peuvent être évoquées comme la pratique de l'exercice physique qui permet d'augmenter l'expression de la LTP et de favoriser l'apprentissage (van Praag, Christie et al. 1999). L'éthanol quant à lui inhibe la LTP, même à faible concentration, ce qui peut être à la base de la perte de mémoire chez les personnes alcoolisées (Blitzer, Gil et al. 1990).

Figure 10



## 2. La dépression à long terme : la LTD

### a) Induction de la LTD

La LTD est le processus inverse de la LTP, puisqu'elle se définit par une dépression synaptique à long terme. La LTD est traditionnellement induite dans l'hippocampe par une stimulation pré-synaptique de basse fréquence (1 à 5 Hz) qui active les NMDAR et les voies sérine/thréonine phosphatase par l'influx de calcium intracellulaire (Dudek and Bear 1992; Malenka and Bear 2004; Massey and Bashir 2007). Cette induction basse fréquence de la LTD peut également être indépendante des NMDAR et mettre en jeu, selon les conditions d'enregistrement, d'autres récepteurs au glutamate comme les récepteurs métabotropiques ou mGluR (Oliet, Malenka et al. 1997). Ces différents protocoles contribuent à réaliser une induction homo-synaptique de la LTD. Depuis lors, plusieurs travaux ont montré que l'un des critères essentiels qui détermine la LTD homo-synaptique est la corrélation temporelle entre l'activité pré-synaptique et la dépolarisation post-synaptique. En effet, la LTD est induite quand l'activité pré-synaptique est plus tardive d'un intervalle de 20 à 100 millisecondes (ms) que la dépolarisation post-synaptique. Si l'activité pré-synaptique précède de 20 ms au plus ou est synchronisée avec la dépolarisation post-synaptique, on obtient une LTP. Cette dépendance temporelle est appelée STDP pour spike-timing-dependent-plasticity (Song, Miller et al. 2000). L'induction de la LTD par un protocole d'appariement entre des activités pré et post-synaptiques asynchrones est qualifiée d'associative. L'implication des NMDAR n'est pas toujours requise pour induire cette LTD associative car dans les neurones hippocampiques l'entrée de calcium peut s'effectuer via les canaux calciques dépendants du voltage (Normann, Peckys et al. 2000) ou provenir des réserves intracellulaires via l'activation des récepteurs à l'IP3 (Reyes and Stanton 1996). Cette libération calcique des réserves intracellulaires serait nécessaire à l'induction de la LTD dépendant des mGluR (Holbro, Grunditz et al. 2009) mais ceci semble contredit dans d'autres études (Luscher and Huber 2010). Comme pour la LTP, le rôle des différentes sous-unités des récepteurs NMDA dans la LTD restent un sujet de débat. Bien que certaines études aient démontré une implication principalement des NMDAR2B dans l'induction de la LTD (Massey, Johnson et al. 2004; Ge, Dong et al. 2010), d'autres travaux suggèrent une implication commune de NMDAR2B et

NMDAR2A dans la LTD par le contrôle composition relative des deux sous-unités à la synapse (Fox, Russell et al. 2006; Cui, Feng et al. 2013).

Contrairement à la LTP, la LTD peut également s'installer lors d'une stimulation hétéro-synaptique (Abraham and Goddard 1983). La transmission hétéro-synaptique se définit par une activation de l'élément post-synaptique sans activation pré-synaptique associée (Massey and Bashir 2007). Cette LTD hétéro-synaptique peut être déclenchée par l'induction de la LTP dans une synapse voisine (Scanziani, Malenka et al. 1996).

Ces processus de plasticité sont tout aussi essentiels que la LTP pour permettre les changements d'efficacité synaptique nécessaires aux processus d'apprentissage et de mémorisation, et mettent en jeu d'autres acteurs que ceux évoqués pour la LTP. Nous allons nous concentrer dans la suite de notre exposé sur la forme la plus courante de LTD dans l'hippocampe qui requiert l'activation des NMDAR (Malenka and Bear 2004). L'entrée de calcium via les NMDAR est indispensable à la mise en place de cette forme de LTD.

#### b) Expression, signalisation et marqueurs

L'expression de la LTD dépend principalement de l'activation de phosphatases comme la Protéine Phosphatase 1 (PP1), la PP2A et la Calcineurine ou PP2B car leur inhibition bloque l'induction de la LTD (Mulkey, Herron et al. 1993; Kirkwood and Bear 1994). Ces enzymes agissent en cascade de telle sorte que la Calcineurine, phosphatase sensible au calcium, provoque indirectement l'activation de PP1 par l'inactivation de son inhibiteur et favorise ainsi l'expression de la LTD (Mulkey, Endo et al. 1994). L'action de ces phosphatases provoque une déphosphorylation des substrats des protéines kinases A et C, ce qui conduit en particulier à la déphosphorylation des récepteurs AMPA sur leur résidu serine 845 (Kameyama, Lee et al. 1998; Lee, Kameyama et al. 1998). On observe parallèlement une baisse d'activité de la protéine kinase C qui est ciblée par les protéines phosphatases PP1 et PP2A (Thiels, Kanterewicz et al. 2000). L'activation différentielle de cette kinase pendant la LTP et la LTD est déterminé par l'activité générée via les NMDAR au niveau post-synaptique (Stanton 1995).

La LTD induit une réorganisation sélective des récepteurs glutamatergiques car il se produit une perte d'expression synaptique des récepteurs AMPA sans modification de la localisation

des récepteurs NMDA (Carroll, Lissin et al. 1999). Cette redistribution des AMPAR résulte en partie de la déphosphorylation du site de la sous unité GluA1 qui est ciblé par la PKA (S845) (Lee, Kameyama et al. 1998), et met en jeu un processus d'internalisation par la voie des Clathrines (Man, Lin et al. 2000). La question se pose d'une éventuelle contribution de la CaMKII pendant la LTD via la phosphorylation sur son site inhibiteur (Thréonine 305/306) qui réduirait ainsi son activité (Coultrap and Bayer 2012). On peut également s'interroger sur le devenir des récepteurs AMPA suite à leur internalisation. Ils peuvent être en effet dirigés soit vers des voies de dégradation via Rab7a soit vers des voies de recyclage via Rab11. Des travaux récents favorisent cette dernière hypothèse (Fernandez-Monreal, Brown et al. 2012).

L'expression de la LTD à long terme nécessite comme pour la LTP une synthèse protéique locale ou dépendante du génome (Kauderer and Kandel 2000). Ces phénomènes pourraient dépendre de l'activation de gènes précoces comme c-Fos par exemple, dont l'expression est amplifiée par la LTD (Kemp, Tischmeyer et al. 2013).

## VIII. Hypothèses de travail

Le Vascular endothelial growth factor (VEGF), initialement étudié pour son rôle dans l'angiogenèse, exerce également des effets directs sur les cellules nerveuses en stimulant la neurogenèse, la survie et la différenciation neuronale. Les derniers travaux de notre équipe ont mis en évidence une nouvelle fonction du VEGF au cours du développement, en montrant qu'il participe à des phénomènes de guidage neuronal dans le Cervelet (Ruiz de Almodovar, Coulon et al. 2010). Nous avons poursuivi cette étude pour analyser les mécanismes impliqués, et révélé que ce guidage dépendant du VEGF met en jeu une augmentation de l'activité des NMDAR (Meissirel, Ruiz de Almodovar et al. 2011). Le VEGF contribue à amplifier l'activité des NMDAR des cellules granulaires avant la mise en place des synapses, et cet effet requiert l'activation du récepteur VEGFR2. L'interaction entre les récepteurs VEGFR2 et NMDAR se traduit par une augmentation de la réponse calcique intracellulaire et stimule une cascade de signalisation intracellulaire impliquant la famille des Src Kinases. Ces résultats m'ont conduit à étudier l'impact du VEGF dans la transmission synaptique dépendant des récepteurs NMDA dans l'hippocampe et ses mécanismes de régulation.





## RESULTATS



# **VEGF modulates NMDA receptor function and synaptic localization in the hippocampus**

De Rossi P<sup>1,2</sup>., Bardin M<sup>1,2</sup>., Chounlamountri N<sup>1,2</sup>., Harde E<sup>6</sup>., Pernet-Gallay K., Benetollo C<sup>2,3</sup>., Honnorat J<sup>1,2</sup>., Aker-Palmer A<sup>6</sup>., Seugnet L<sup>1,5</sup>., Salin PA<sup>2,4</sup>., Meissirel C<sup>1,2</sup>.

1) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 1028, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 5292, Neurooncology and Neuroinflammation, Lyon Neuroscience Research Center, F-69000 Lyon, France; 2) University Lyon 1, F-69000 Lyon, France ; 3) INSERM Unité 1028, CNRS UMR 5292, Functional neurogenomics and optogenetics; 4) INSERM Unité 1028, CNRS UMR 5292, Physiopathology of the Sleep Neuronal Networks, Lyon Neuroscience Research Center, F-69000 Lyon, France ; 5) INSERM Unité 1028, CNRS UMR 5292, Integrative Physiology of Brain Arousal Systems, Lyon Neuroscience Research Center, F-69000 Lyon, France. 6) Franckfurt Institute for Molecular Life Sciences (FMLS) and Institute of Cell Biology and Neuroscience, Goethe University Franckfurt, Max-Von-Laue-Str. 9, D-60438, Germany.

## INTRODUCTION

Increasing evidence indicate that VEGF and its receptor VEGFR2 are involved in plasticity related events including adult neurogenesis and hippocampus dependent form of synaptic plasticity and memory (Tillo, Ruhrberg et al. 2012; Licht and Keshet 2013). Thus, VEGF over-expression obtained *in vivo* by intracerebral administration of VEGF, gene transfer or in conditional transgenic animal models, triggered a VEGFR2-mediated increase in adult neurogenesis in neurogenic regions in the subventricular zone and the subgranular zone of the dentate gyrus (Jin, Mao et al. 2000; Jin, Zhu et al. 2002; Cao, Jiao et al. 2004; Schanzer, Wachs et al. 2004; Licht, Goshen et al. 2011). The neurogenic impact of VEGF was associated with improvements in hippocampal dependent cognition that required an increase in hippocampal VEGF expression (Cao, Jiao et al. 2004; Licht, Goshen et al. 2011). In contrast, endogenous VEGF depletion via shRNA silencing or inducible expression of a VEGF trap leads to altered hippocampal neurogenesis in response to enriched environment (Cao, Jiao et al. 2004; During and Cao 2006) or to selective deficits in cognition (Licht, Goshen et al. 2011). These findings raised the possibility that VEGF acts to mediate the cross-talk between hippocampal neurogenesis and learning and memory processes. However, Licht and coworkers elegantly demonstrated that short induction or blockade of VEGF significantly impact on associative learning performances prior to the integration of new neurons in the hippocampal network (Licht, Goshen et al. 2011). The author further proposed that VEGF-dependent changes in synaptic plasticity in the dentate gyrus could account for gain or deficit in memory performances (Licht, Goshen et al. 2011). Yet, the underlying mechanisms responsible for the VEGF effect on hippocampal synaptic plasticity remain to be demonstrated.

The NMDA type of glutamate receptor (NMDAR) is a ionotropic receptor permeable for  $\text{Ca}^{2+}$  that form di and tri-heteromeric assemblies including the obligatory GluN1 subunit and GluN2A and/or GluN2B subunits in the hippocampus (Paoletti, Bellone et al. 2013). Extensive research studies have focused on the contribution of NMDAR in synaptic transmission and plasticity with a specific interest for the network between CA3 and CA1 pyramidal cells in the hippocampus (Luscher and Malenka 2012; Bliss and Collingridge 2013). These exquisitely defined synaptic processes raise the possibility to uncover new actors that may play critical roles in regulating the efficacy of glutamatergic synaptic transmission. Recently, we

documented a new crosstalk between VEGFR2 and NMDAR that mediates the guidance of cerebellar granule neurons prior to synapse formation (Meissirel, Ruiz de Almodovar et al. 2011). The chemotropic activity of VEGF we reported (Ruiz de Almodovar, Coulon et al. 2010) rely on the induction of Src Family Kinase-dependent mechanisms via VEGFR2 that trigger activation of GluN2B expressing NMDAR (NMDAR2B) and amplify their function (Meissirel, Ruiz de Almodovar et al. 2011). One intriguing possibility is that this VEGFR2-NMDAR interaction could be involved in the VEGF-dependent increase in synaptic transmission and plasticity described in cultured hippocampal neurons (Kim, Choi et al. 2008). Given that VEGF was previously shown to trigger calcium influx in hippocampal neurons and to activate signaling molecules linked to synaptic activity (Kim, Choi et al. 2008), we proposed that VEGF could modulate NMDAR-mediated synaptic function in hippocampal pyramidal cells.

In the present study, we underscored the molecular mechanism implicated in the VEGF effect on excitatory synaptic function. We first demonstrated that VEGF is able to potentiate NMDAR postsynaptic responses in hippocampal pyramidal cells in slices, via the contribution of NMDAR2B and VEGFR2. Furthermore, we showed that coincident activation of VEGF and NMDA receptors in cultured hippocampal neurons induced a coordinated remodeling of NMDAR2B and AMPA receptor content at postsynaptic sites in link with CaMKII and PLC $\gamma$  activation. Finally we uncovered a morphological reorganization of hippocampal postsynaptic densities in response to this coincident activation that is known to occur during events related to synaptic plasticity.

## MATERIALS AND METHODS

### ANIMALS

For conditional transgenic mice, pups (P14-P15) bearing a conditional and null VEGFR2 alleles and heretozygous for Nestin Cre (VEGFR2<sup>lox/-</sup> Cre<sup>+</sup>) or negative for nestin Cre (VEGFR2<sup>lox/-</sup> Cre<sup>-</sup>) as well as Cre negative controls (VEGFR2<sup>lox/lox</sup> Cre<sup>-</sup>) (Haigh et al. 2003) were used after PCR genotyping validation for whole cell patch clamp recordings. C57Bl6J pups (P14-P15) were also used for *recordings*, cell culture, immunoblotting and immunostaining, and all animals were treated according to the guidelines approved by the French Ethical Committee (decree 87-878).

### CULTURE AND TREATMENTS

**HIPPOCAMPAL CELL CULTURE** Primary hippocampal cell cultures were prepared from embryonic day 17 C57Bl6 mice, as previously described (Goslin et al. 1998) Briefly, hippocampi were removed, cut into pieces, treated with trypsin (0.5% w/v) and DNase (0.01% w/v) in HBSS-Glucose (D-Glucose, 0.65 mg/ml) and triturated with glass pipettes to dissociate tissue in Neurobasal medium (NB) supplemented with glutamine (2 mM), 2% B27, 100U penicillin-streptomycin and D-Glucose (0.65 mg/ml). Hippocampal cells were then plated onto poly-D-lysine/ laminin coated coverslips at either low density (1.9 x 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>) or high density (4x10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>). Cells were subsequently cultured in supplemented NB medium at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>, one-half of the medium changed every 2 days, and used after 15 days in vitro (DIV). Finally, cells were left untreated or treated with NMDA (50 μM), VEGF (50 ng/ml) or NMDA + VEGF for 15 minutes.

**FLK1 SILENCING** High density hippocampal cultures were transfected at 11 DIV using lipofectamine reagent LTX (Invitrogen) in Neurobasal medium. Plasmids encoding a shRNAi for Flk1 or a shScramble (as a control) were used in association with an EGFP-expression vector in a 5:1 ratio. Four hours post-transfection, culture medium was replaced by Neurobasal medium (NB) supplemented with glutamine (2 mM), 2% B27, 100U penicillin-streptomycin and D-Glucose (0.65 mg/ml). At 15 DIV hippocampal cells were treated as described above and processed for cell surface immunostaining. Hippocampal pyramidal cells were

subsequently selected based on their morphology and EGFP fluorescence prior to image acquisition.

**HETEROLOGOUS CELLS** HEK-293 cells were plated at a density of  $4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> and cultured for 2 days in DMEM supplemented with 10% FBS before transfection with Lipofectamine LTX (Invitrogen). The following plasmids were used for transfection: GluN1, GluN2A, GluN2B, Flk1, EGFP, and PSD95. For HEK cells expressing recombinant NMDAR or isolated subunits, medium was supplemented with the NMDAR antagonist Ketamine (500  $\mu$ M) to prevent excitotoxic cell death.

**LIVE/DEAD CELL ASSAY** To determine the impact of the treatments on cell viability, a fluorescent-based assay was used for live (green) /dead (red) cell discrimination (Live/dead viability/cytotoxicity kit for mammalian cells, L3224, Molecular probes). Living cells were detected with Calcein AM (5/10000 in sterile PBS) which is hydrolyzed into a green fluorescent compound indicating intracellular esterase activity, whereas the red fluorescent ethidium homodimer-1 (5/10000 in sterile PBS) indicated loss of plasma membrane integrity in dying cells. Both components were incubated during 30 min after NMDA/VEGF treatments and cells were imaged directly without any fixation. Images were acquired with a Zeiss microscope equipped with Apotome technology (63x objective), differential interference contrast microscopy (DIC) to control cell morphology and the software Axiovision (Zeiss). Quantitative analyses were performed using Image J (MBF Image J, McMaster Biophotonics Facility) and normalized to the total cell number per condition.

## **HISTOLOGY, IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND CELL SURFACE IMMUNOSTAINING**

**HIPPOCAMPAL SLICE IMMUNOSTAINING** Coronal hippocampal slices from postnatal day 15 (P15) C57/Bl6 mice were cut at 50 $\mu$ m thickness in aCSF containing 85 mM NaCl, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM Glucose and 75 mM sucrose. Slices were fixed in 4% PFA with 4% sucrose for 2 hours and processed for immunostaining. Briefly, slices were permeabilized in 0.3% triton with 1% BSA in PBS, and ligand and receptor were stained overnight at 4°C in the same buffer with antibodies directed against VEGF (1/500, A20, Santa Cruz Biotech) and intracellular epitopes of Flk1 (1/100, A3, Santa Cruz Biotech). Subsequently slices were incubated for 2 hours at RT with fluorescently conjugated secondary antibodies, respectively, an Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit for VEGF



(1/1000, Molecular Probes) and an Alexa Fluor 488 goat anti-mouse for Flk1 (1/1000, Molecular Probes). After staining slices were counterstained with DAPI (1/50, Roche).

**CELL SURFACE IMMUNOSTAINING** Surface receptor expression was assayed in 15 DIV treated and untreated hippocampal cell cultures. Cultures were fixed in 4% PFA with 4% sucrose for 4 minutes at RT prior to immunostaining under non-permeabilizing conditions (Bhattacharyya, Biou et al. 2009) with antibodies recognizing respectively the extracellular domain of Flk1 (1/200, AF644, R&D), the N terminus of the GluN2B subunit of NMDAR (1/200, 718600, Invitrogen) or the extracellular region of the GluA1 subunit of AMPAR (1/60, PC246, Calbiochem). Subsequently cells were incubated for 2 hours at RT with secondary antibodies including Alexa Fluor 546 donkey anti-goat for Flk1 (1/1000, Molecular Probes), Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit for GluN2B or GluA1 (1/1000, Molecular Probes). Cells were then permeabilized in PBS with 1%BSA and 0.3% Triton X-100 for 30 min at RT and processed for synapse immunostaining with antibodies raised against the presynaptic Synapsin (1/500, 106-011BT, SYSY Synaptic System) or the postsynaptic PSD95 (1/300, MA1-045, pierce antibody) followed by a streptavidin-647 conjugate (1/300, Molecular Probes) or a biotinylated secondary antibody (1/1000, Jackson immunoresearch) and a streptavidin-647 conjugate (1/300, Molecular Probes). Finally, counterstainings were performed with DAPI (1/50, Roche) and immunostainings observed using a Zeiss microscope equipped with epifluorescent illumination and Apotome technology.

**IMAGE ACQUISITION AND ANALYSIS** Hippocampal pyramidal cells were selected based on their morphology and imaged with a Zeiss microscope equipped with Apotome technology (63x objective) using Axiovision (Zeiss). Images were obtained under identical acquisition parameters and analyzed with Image J software (MBF Image J, McMaster Biophotonics Facility). They were subsequently thresholded and deconvoluted with the 2D spectral deconvolution Image J plugin to assess dendritic area. Surface receptor cluster were defined as fluorescence signal being fivefold above background fluorescence and ranging from 0.40 to 0.60  $\mu\text{m}$  in diameter. Regions of interest (ROIs) were centered on the apical dendrite of each hippocampal pyramidal cell and receptor cluster density quantified in each ROI in collapsed Z-stacks. Co-localized clusters were identified using the co-localization analysis plug-in of Image J (Intensity Correlation Analysis) and their location was further validated for each channel. Receptor clusters were defined as synaptic if co-localized within a distance of 0.60  $\mu\text{m}$  with a

synapsin or PSD95 cluster. Data were expressed as mean  $\pm$  SEM, n value referring to the number of cells analyzed, and compared using a one way ANOVA combined with post hoc t-test.

## ELECTROPHYSIOLOGICAL RECORDINGS

Whole cell patch-clamp recordings were performed on acute coronal hippocampal slices from P15 C57Bl6J mice. Brain were removed, placed in cool saline and cut with a vibratome (Leica VT1000S) into 350  $\mu$ m thick slices. The saline solution used for slicing contained 85 mM NaCl, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM Glucose and 75 mM sucrose. Slices were maintained at RT in the incubation solution equilibrated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Hippocampal cells were recorded in CA1 and CA3 regions in the lower Stratum pyramidale (SP) with an Axopatch 200A amplifier (Axon instruments) under visual control using an infrared upright microscope equipped with Nomarski differential interference contrast optics (BX50WI, Olympus). Internal recording solution contained 120 mM Cesium-gluconate, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM phosphocreatine, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM Na ATP, 0.4 mM GTP and 10 mM HEPES (300 mOsm at pH 7.2). The typical pipette resistance was  $\sim$ 5 M $\Omega$ . The perfusion solution contained: 124 mM NaCl, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.3 mM MgCl<sub>2</sub> and 10 mM glucose. Only CA1 and CA3 pyramidal cells with visible proximal apical dendrite were recorded in voltage-clamp mode. CA1 pyramidal cells were recorded at -70 mV (Mg<sup>2+</sup>-free perfusion solution) or at +40 mV (perfusion solution with 1.3 mM MgCl<sub>2</sub>) whereas for CA3 pyramidal cells at +40 mV perfusion solution contained 4 mM MgCl<sub>2</sub> and 4mM CaCl<sub>2</sub> to block the polysynaptic activity of CA3 recurrent connections. To record NMDAR mediated currents, the perfusion solution contained the GABA-A receptor antagonist picrotoxin (PTX, 100 $\mu$ M, Tocris) and the AMPA-kainate receptor antagonists (NBQX, 5-10  $\mu$ M in CA1 or CNQX 20  $\mu$ M in CA3). NMDARs mediated responses were blocked using the selective NMDAR antagonist D-APV (2-amino-5-phosphonovaleric acid, 50  $\mu$ M, Tocris) or the specific NMDAR open channel blocker MK801 (40-50  $\mu$ M, Tocris). In addition, to identify the subtypes of functional NMDAR involved, antagonists selective for GluN2B expressing NMDAR (Ifenprodil, 6 $\mu$ M, Tocris) or GluN2A expressing NMDAR (NVP-AAM077, 50nM, Novartis) were applied. Then CA1 and CA3 pyramidal cells were stimulated with a stimulating electrode (bipolar tungsten electrode) placed near the proximal apical dendrite. Base line activity was recorded for 10 minutes and

a local VEGF application (R&D system, 150 ng/mL) was performed with a Picosprizer II (pulse 0.1Hz, 50 ms duration) at ~20  $\mu$ m from the apical dendrite of the recorded pyramidal cell. On- and off-line data analyses were carried out with Acquis1 (G. Sadoc, CNRS-ANVAR, France). All summary data were expressed as mean  $\pm$  SEM. For statistical analysis a paired student t test was used.

## IMMUNOPRECIPITATION AND IMMUNOBLOTTING

*For heterologous HEK cells*, cell extracts were collected 48 hours post-transfection on ice, in lysis buffer (50mM tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP40, 0.5% DOC, and 0.1% SDS, complemented with proteinase and phosphatase inhibitors) and centrifuged at 16000g at 4°C. 5% of the supernatant was used to determine total protein concentration, 10% for total protein analysis and 85% for immunoprecipitation. For immunoprecipitation, lysates were incubated with the recombinant extracellular domain of the mouse VEGFR2 fused to the His-tag (R&D system, 443-KD, 2 $\mu$ g/100 $\mu$ g protein) overnight at 4°C with slow rotation. Then  $\mu$ MACs epitope Tag Protein Isolation Kit (Miltenyi Biotec, anti-His microbeads) was used to precipitate protein complexes following manufacturer's instructions. Proteins were separated on SDS-PAGE gels 4-12% (Precast Gels, BioRad), transferred on nitrocellulose membranes and immunoblotted. For immunoblotting, mouse anti-GluN1 (05-432, 1/300, Millipore), rabbit anti-GluN2A (1555P, 1/500, Chemicon), rabbit anti-GluN2B (1557P, 1/500, Chemicon), mouse anti-Flk1 (A3, 1/500, Santa Cruz), Goat anti-Flk1 (AF644, 1/300, R&D sytem), anti-PSD95 (MA1-045, 1/500, Pierce), anti-actin (A2066, 1/1000, Sigma Aldrich) antibodies were used overnight at 4°C. Horseradish Peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit, anti-mouse or anti-goat were used as secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) and immunoblots were revealed with an enhanced chemoluminescence (ECL) detection system (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, 34080). Blots were analyzed with optical densitometry assessment using Image J software (MBF Image J, McMaster Biophotonics Facility) and normalized to actin levels. For total lysate analysis, data were obtained from at least 5 independent experiments and arbitrary values were normalized to control. All data were presented as mean  $\pm$  SEM and compared using a one way ANOVA, for multiple comparisons.

*For hippocampal cells*. 15 DIV hippocampal cells were harvested in lysis buffer and centrifuged at 800g at 4°C. Proteins were separated on 3-8% Tris-acetate precast gels (BioRad), and

transferred on nitrocellulose membranes. For immunoblotting, rabbit anti-phosphoT286-CaMKII (1/500, Cell Signaling, 3361S), Rabbit anti-phosphoT305-CaMKII antibody (1/500, AB3865, Millipore), mouse anti-CaMKII antibody (1/10000, AbCam, 22609), rabbit anti-phosphoY416-Src family (1/1000, Cell Signaling, 2101), rabbit anti-Src antibody (1/1000, Cell Signaling, 2108), rabbit anti-phosphoY458-PI3K (1/1000, Cell Signaling, 4228), rabbit anti-PI3K (1/1000, Cell Signaling, 4257), rabbit anti-phosphoY783-PLC $\beta$ 1 (1/1000, Cell Signaling, 2821), rabbit anti-PLC $\beta$ 1 (1/1000, Cell Signaling, 2822), and anti-Actin (1/1000, A2066, Sigma Aldrich) antibodies were used. Specific binding was detected with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies and visualized with ECL. Analyses were performed as previously above.

**ISOLATION OF THE PSD FRACTION** Postsynaptic density fractions were prepared as previously described (El Gaamouch, Buisson et al. 2012) from treated and untreated 15 DIV hippocampal cell cultures. Briefly cells were harvested in cold buffer containing 0.32 M sucrose and 10 mM HEPES at pH 7.4 and centrifuged twice to remove nuclei and large debris (P1), and to obtain a crude membrane fraction (P2). P2 was pelleted in EDTA buffer to chelate calcium (4mM HEPES, 1mM EDTA, pH=7.4, 20 min at 12000g). Pellets were incubated in a low-triton buffer for 15 minutes (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.5% triton X, pH= 7.2) and centrifuged at 12000 G to pellet the synaptosomal fraction. The supernatant contained the non-postsynaptic density fraction (non-PSD). The resulting pellet was further extracted with a high-detergent buffer during 1 hour (20 mM HEPES, 0.15 mM NaCl, 1% triton X100, 1% deoxycholic acid, 1% SDS, pH= 7.5) and subsequently centrifuged 15 minutes at 10000 G to obtain the postsynaptic density fraction (PSD). Membranes loaded with PSD and non-PSD fractions were incubated with mouse anti-PSD95 (1/500, MA1-045, Pierce), rabbit anti-pT286-CaMKII antibody (1/500, Cell Signaling, 3361S), rabbit anti-pT305-CaMKII antibody (1/500, AB3865, Millipore), mouse anti-CaMKII antibody (1/10000, AbCam, 22609), anti-Actin antibody (1/1000, A2066, Sigma Aldrich), rabbit anti-GluN2B antibody (1/500, AB1557P, Millipore), rabbit anti-GluA1 antibody (1/500, C3T, Millipore), mouse anti-Flk1 (1/500, A3, Santa Cruz) antibodies and further processed for immunoblotting.

### ***Electron microscopy***

Hippocampal cell cultures were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4). Subsequently cells were embedded in 10% gelatin in 0.1 M cacodylate and postfixed for

1 h at 4°C in 1% osmium tetroxide and 0.1 M cacodylate (pH 7.2). Staining were then performed at 4°C using 1% uranile acetate (pH 4) for 1 h and cells were dehydrated in graded alcohol baths. After infiltration with epon/alcohol for 1 hour and subsequent baths, cells were included in resin before polymerization for 72 hours at 60°C. Ultra-thin sections of were performed usingan ultramicrotome (Leica) and sections were stained in 5% uranile acetate and 0.4% lead citrate prior to observation using an electron microscope at 80 kV (JEOL 1200EX). 35, 38, 39 and 32 cells were analysed respectively in control, VEGF, NMDA and NMDA+VEGF condition. PSDs size and area were compared by ANOVA and post hoc t test.

## RESULTS

### **VEGF / VEGFR2 signaling increases NMDAR dependent synaptic transmission in hippocampal pyramidal cells**

Our goal was to determine whether VEGF might regulate glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. To obtain clues about VEGF function in this process, we first investigated the spatial distribution of VEGF and VEGFR2 proteins in P15 hippocampal slices using immunohistochemistry. Both VEGFR2 and VEGF were expressed in overlapping and specific patterns, most prominent in pyramidal cell layer and proximal dendritic field in CA3 (Fig 1C), and to a lesser extent in CA1 (Fig 1A). The VEGFR2 immunoreactivity on the proximal dendrites of pyramidal cells was coincident with the termination zone of mossy fiber and associative commissural afferents in CA3 (Fig 1D), and with Schaffer collateral terminals in CA1 (Fig 1D). Thus, our data showed that VEGF and its receptor VEGFR2 are expressed in a complementary pattern in the hippocampus and indicate that pyramidal cells from CA1 and CA3 have the capacity to respond to endogenous VEGF.

Therefore, we studied the VEGF effect on NMDAR-mediated synaptic transmission at Schaffer collateral-CA1 synapses and mossy fibers-CA3 synapses in acute hippocampal slices from P15 animals. NMDAR excitatory postsynaptic currents (EPSCs) were recorded in whole-cell patch clamp configuration in presence of specific GABAA and AMPA receptor antagonists. We then compared evoked synaptic responses before and after local VEGF application in CA1 or CA3. We favored local VEGF application (150 ng/ml in puff pipette) to the proximal apical dendrite of the recorded cell upon bath application to minimize possible indirect interactions through endothelial cells. VEGF triggered a robust and progressive increase in NMDAR EPSC amplitude in pyramidal cells from both regions that was selectively blocked by the NMDAR antagonists' ifenprodyl, MK801 and D-APV (Fig 2 A, D). In CA1 pyramidal cells, VEGF increased the NMDAR mediated EPSCs within 5 to 10 minutes by more than 3 fold (Fig 2C). To determine whether this VEGF dependent increase in NMDAR postsynaptic responses is due to a presynaptic increase in glutamate release probability or alternatively to a postsynaptic event, we compared the paired-pulse facilitation (PPF) obtained in baseline condition and after VEGF application. Two stimuli were applied at short intervals to induce a presynaptic facilitation of glutamate release and the PPF ratio was calculated by dividing the amplitude of the second EPSC by the amplitude of the first one. Decrease in PPF ratio generally reflects an increase in

release probability but VEGF didn't trigger any change in this ratio (Fig 2 B, D), indicating that presynaptic function would not appear to account for our findings. To confirm these results, we compared the ratio of  $1/CV^2$ , where CV is the coefficient of variation of EPSC amplitudes, prior to and after VEGF stimulation to detect changes in presynaptic function.  $1/CV^2$  for the NMDAR-mediated EPSCs remained stable after VEGF application (Fig 2 B, D), arguing a postsynaptic involvement of VEGF in the NMDA-mediated synaptic transmission.

Next, we explored whether VEGFR2 mediates the VEGF-dependent effect on the postsynaptic response of pyramidal cells, using slices from genetically engineered mice. We used conditional mice that express the Cre recombinase under nestin promoter control and are characterized by a selective VEGFR2 deletion in neural cells (Haigh, Morelli et al. 2003). Whole cell patch clamp recordings were performed in hippocampal slices from mice bearing a conditional and null VEGFR2 alleles and heretozygous for nestin Cre (VEGFR2<sup>lox/-</sup> Cre<sup>+</sup>) and Cre negative mice carrying the null VEGFR2 allele (VEGFR2<sup>lox/-</sup> Cre<sup>-</sup>). VEGFR2<sup>lox/-</sup> Cre<sup>-</sup> slices display increased responses when cells were stimulated with VEGF,  $100 \pm 14.9\%$  with baseline in Cre<sup>-</sup>, versus  $151.6 \pm 19.3$  with VEGF, N= 14,  $p < 0.0001$ , (Fig 2 E upper panel, F). In contrast, VEGF failed to induce any change in NMDA EPSCs in VEGFR2<sup>lox/-</sup> Cre<sup>+</sup> mutant slices,  $100 \pm 21\%$  with baseline in Cre<sup>+</sup> versus  $123.3 \pm 24$  with VEGF, N = 6,  $p > 0.05$ , (Fig 2E bottom panel, F). Thus, complete silencing of VEGFR2 in neural cells blocked the VEGF-dependent amplification of NMDAR postsynaptic responses in pyramidal cells from the CA1 region.

### **VEGF effect requires the contribution of GluN2B subunit**

To gain insight into the NMDAR subunit involved in this VEGF induced potentiation effect, we examined NMDAR postsynaptic responses in hippocampal slices treated with GluN2B or GluN2A selective antagonists (respectively ifenprodyl and NVP-AAM077). Because NVP-AAM077 only displays 10 fold selectivity for GluN2A over GluN2B, we selected a concentration reported to exclusively block GluN2A expressing NMDAR (Neyton and Paoletti 2006). With ifenprodyl treatment, VEGF failed to induce a significant increase in NMDA EPSCs (100% with ifenprodyl preincubation versus  $119.7 \pm 17.2$  with VEGF, N=7,  $p=0.13$ ), whereas NVP-AAM077 application had no significant effect and didn't prevent the VEGF-dependent potentiation of the response (100% with NVP-AAM077 preincubation versus  $142.1 \pm 18.1$  with VEGF, N= 5,  $p=0.025$ ) (Fig 3A). In addition, VEGF induced a tendency toward an increase in NMDAR decay



time with NVP-AAM077,  $100\% \pm 11.4$  with NVP-AAM077 preincubation versus  $119.4 \pm 4.4$  with VEGF,  $N=5$ , NS, (Fig 3B), indicating a synaptic recruitment of GluN2B expressing NMDAR upon VEGF stimulation. We recently reported that VEGFR2 was capable of interacting with GluN2B expressing NMDAR (Meissirel, Ruiz de Almodovar et al. 2011) and further investigated the molecular basis of this interaction in HEK-293 cells. For this analysis, we performed immunoprecipitation studies using a recombinant protein including the mouse VEGFR2 extracellular domain fused to a histidine tag (ECD-VEGFR2) and anti-histidine microbeads. ECD-VEGFR2 coupled microbeads were immobilized on a dedicated column and we applied lysates of HEK cells transfected only with GluN1 or co-transfected with GluN1 and GluN2B. Resulting precipitates were immunoblotted for GluN1, GluN2B or VEGFR2, revealing that ECD-VEGFR2 coimmunoprecipitated specifically with the GluN2B subunit or with GluN1/GluN2B but not with GluN1 (Fig 3D). To test the validity of our precipitation assay we verified that ECD-VEGFR2 was able to coimmunoprecipitate VEGFR2 (Fig 3D). Thus, altogether our data indicate that GluN2B expressing NMDAR (NMDAR2B) mediate the VEGF dependent increase in NMDAR postsynaptic responses in hippocampal cells, and that these receptors may interact with the extracellular domain of VEGFR2.

### **VEGF and NMDA receptor co-activation promotes synapse formation and NMDAR2B recruitment to synapses**

We previously showed that postsynaptic mechanisms underlie the VEGF-dependent increase in NMDAR synaptic transmission, and may involve an increase in NMDAR2B synaptic expression and/or change in receptor function. To further test whether VEGF is able to recruit NMDAR2B to synaptic sites in hippocampal neurons, we performed dissociated hippocampal cultures. We selected stimulation protocols previously reported to induce activation of the total pool of NMDAR or VEGFR2 in hippocampal neurons (Kim, Choi et al. 2008; Hoey, Williams et al. 2009), and exposed our cultures to either NMDA or VEGF bath applications or combined NMDA and VEGF stimulations. In agreement with other studies (Hoey, Williams et al. 2009; Navon, Bromberg et al. 2012), treatment of hippocampal neurons with NMDA for 15 minutes did not cause toxicity as assessed by quantifying the proportion of living and dead cells with Live/dead assay (Fig 4). In addition, our observation that brief VEGF application failed to increase cell viability (Fig 4) is consistent with previous data showing no survival promoting effect of VEGF on hippocampal immortalized cells at the same concentration and long lasting



exposure (Jin, Mao et al. 2000).

Our goal was now to assess the impact of NMDAR and VEGFR2 activation on the cell surface and synaptic expression of VEGFR2 and NMDAR2B in hippocampal pyramidal cells. To compare the expression and localization of these receptors between treatments, we first quantified the density of cell surface clusters of receptors in apical dendrites of cultured pyramidal cells. Synaptic sites were identified with the commonly used presynaptic vesicle marker synapsin and the postsynaptic density marker PSD95. For cell surface expression, we fixed hippocampal cultures without permeabilization as previously reported (Bhattacharyya, Biou et al. 2009), and immunostained surface GluN2B and VEGFR2 with antibodies directed against extracellular epitopes of each protein. Then, cultures were permeabilized before proceeding to synapse immunostaining with synapsin or PSD95 dedicated antibodies. Representative labeling of GluN2B and VEGFR2 dendritic surface expression as well as staining of synaptic sites are illustrated for each treatment on Figure S1. Quantitative imaging showed that VEGF, NMDA and combined VEGF and NMDA treatments decreased GluN2B surface expression in dendrites, expressed as cluster density per  $\mu\text{m}^2$  of dendrite ( $100\% \pm 4.9$  in control versus  $81.6 \pm 4.3$  with VEGF,  $N=16-12$ ,  $p=0.003$ ;  $100\% \pm 4.9$  in control versus  $71.6 \pm 4.4$  with NMDA,  $N=16-9$ ,  $p<0.0001$ ;  $100\% \pm 4.9$  in control versus  $80.8 \pm 4.4$  with NMDA+VEGF,  $N=16-8$ ,  $p=0.007$ ) (Fig 5A). In contrast, these treatments didn't affect dendritic surface expression of VEGFR2 (Fig 5B). Analysis of synaptic sites identified as synapsin clusters revealed that their density is increased only with the combined VEGF and NMDA treatment and was not affected in the other conditions ( $100\% \pm 14.4$  in control versus  $143.5 \pm 14.6$  with NMDA+VEGF,  $N=16-8$ ,  $p=0.004$ ) (Fig 5C). We then determined for each treatment the density of synaptic GluN2B and VEGFR2 clusters on pyramidal cell dendrites that were defined respectively as GluN2B/synapsin and VEGFR2/synapsin co-clusters. Combined VEGF and NMDA treatment resulted in a significant increase in density of GluN2B/synapsin co-clusters compared to other conditions ( $100\% \pm 16.3$  in control versus  $167.4 \pm 13.3$  with NMDA+VEGF,  $N=16-8$ ,  $p=0.003$ ;  $99.2\% \pm 10$  with VEGF versus  $167.4 \pm 13.3$  with NMDA+VEGF,  $N=12-8$ ,  $p=0.004$ ;  $85.4\% \pm 13.4$  with NMDA versus  $167.4 \pm 13.3$  with NMDA+VEGF,  $N=9-8$   $p=0.001$ ), indicating that only the co-activation of NMDAR and VEGFR2 is capable of targeting NMDAR2B to synapses (Fig 5D). Consistent with our data showing that VEGFR2 can associate with GluN2B via its extracellular domain, the amount of VEGFR2 at synapses was also larger after NMDAR

and VEGFR2 co-activation ( $100\% \pm 20$  in control versus  $190.9 \pm 8.1$  with NMDA+VEGF,  $N=16-8$ ,  $p<0.0001$ ;  $106.8\% \pm 8.7$  with VEGF versus  $190.9 \pm 8.1$  with NMDA+VEGF,  $N=12-8$ ,  $p=0.002$ ;  $112.6\% \pm 17$  with NMDA versus  $190.9 \pm 8.1$  with NMDA+VEGF,  $N=9-8$   $p=0.007$ ) (Fig 5E). These findings lead us to hypothesize that these receptors may interact with each other at synapses. Thus, in a first step, we examined the pattern of co-localized GluN2B and VEGFR2 immunostainings in area positive for synapsin that were used as a template. These results indicated that combined VEGF and NMDA treatment increased GluN2B and VEGFR2 co-localization at synapses when compared to control and NMDA conditions. Together our findings demonstrate that co-activation of NMDA and VEGF receptors in hippocampal neurons is required to trigger an increase in synapse number and promotes synaptic targeting of NMDAR2B and VEGFR2. In addition, they show that these receptors can be distributed in close proximity at synapses, which may facilitate molecular interactions and further crosstalk.

### **VEGFR2 regulates synapse formation in hippocampal neurons**

To confirm the role of VEGF/VEGFR2 signaling in synapse formation in hippocampal neurons, we performed VEGFR2 loss of function experiments in our cultures via co-transfection with specific VEGFR2 shRNA or scramble constructs, and eGFP expression vector. Consistent with a previous work (Meissirel, Ruiz de Almodovar et al. 2011) VEGFR2 silencing abolished the expression of the receptor in lysates of HEK-293 cells designed to overexpress it and immunoblotted with two different VEGFR2 antibodies. In contrast, the scramble vector was ineffective in reducing the HEK cell VEGFR2 over-expression (Fig 6A). We therefore examined the impact of VEGFR2 silencing on the cell surface expression of GluN2B and synapse number in GFP expressing hippocampal pyramidal cells. The density of GluN2B and synapsin clusters was analyzed in GFP neurons expressing VEGFR2 or scramble shRNA, for VEGF, NMDA and combined VEGF and NMDA treatments. When scramble shRNA was co-transfected with GFP in pyramidal cells, we observed a tendency toward a decrease in GluN2B cell surface expression with the NMDA treatment compared to control condition, that became significant when compared to the combined treatment (Fig 6B). Such discrepancy may result in part from the large variability in GluN2B cell surface expression observed in our control condition. In contrast, VEGFR2 silencing abrogated the change in GluN2B expression with NMDA treatment (Fig 6B), suggesting that VEGF/VEGFR2 signaling might be instrumental in regulating GluN2B cell surface expression. We further analyzed the distribution of synapsin clusters in these co-

transfected pyramidal cells to determine whether VEGFR2 silencing mitigates the increase in synapse number observed with the VEGF and NMDA combined treatment. Transfection with the scramble shRNA did not alter the increase in synapse number due to VEGF and NMDA combined treatment but also induced an enhancement in the other conditions ( $100\% \pm 16.8$  in control versus  $162.5 \pm 15.1$  with VEGF,  $N=10-19$ ,  $p<0.05$ ;  $100\% \pm 16.8$  in control versus  $159.3 \pm 11.9$  with NMDA,  $N=10-20$ ,  $p<0.05$ ;  $100\% \pm 16.8$  in control versus  $153\% \pm 12.7$  with NMDA+VEGF,  $N=10-22$   $p<0.05$ ) (Fig 7C). On the other hand, VEGFR2 inactivation in pyramidal cells abolished the formation of new synapses induced by the co-activation of VEGF and NMDA receptors or the other treatments. Thus, these data indicate that the VEGF and NMDA dependent increase in synapse number is mediated through the activation of VEGFR2 in hippocampal pyramidal cells.

### **Co-activation of VEGF and NMDA receptors leads to enrichment in postsynaptic NMDAR2B**

Based on our electrophysiological and immunocytochemical findings, we established a link between VEGF-dependent potentiation of postsynaptic NMDAR2B function and GluN2B synaptic targeting in hippocampal neurons. To further demonstrate the involvement of this synaptic targeting process in neurons in which VEGF and NMDA receptors are co-activated, we isolated their PSD fraction from treated hippocampal cultures as previously shown (El Gaamouch, Buisson et al. 2012), and analyzed the expression of GluN2B, VEGFR2 and PSD95. To validate the purification protocol, we compared the expression of PSD95 in PSD and non PSD fractions. Analysis of fractions by immunoblotting confirmed the well-known enrichment of PSD95 in PSDs (Dosemeci, Makusky et al. 2007), whereas it was poorly expressed in non PSD (Fig 7A). Consistent with our immunocytochemical findings showing that VEGF and NMDA receptor co-activation increased the density of PSD95 clusters in hippocampal neurons, PSD95 expression level was significantly enhanced in PSD fractions under VEGF and NMDA combined treatment, compared to control condition ( $100\%$  in control versus  $201.95 \pm 52.8$  with NMDA+VEGF,  $N=10$  independent experiments,  $p=0.01$ ) (Fig 7A, B). In contrast, when total PSD95 protein level was analyzed from hippocampal cell lysates no detectable changes were found with VEGF and NMDA combined treatment (results not shown). Thus, these results indicate that co-activation of VEGF and NMDA receptors in hippocampal neurons affects the cellular localization of the postsynaptic protein PSD95 by triggering its redistribution to synapses and accumulation in PSD. Given the major role of PSD95 in the postsynaptic

stabilization of NMDAR2B (Kornau, Schenker et al. 1995), its enrichment in PSDs may partly explain the above-mentioned increase in NMDAR2B synaptic activity by VEGF. In addition, our data provide the first evidence that VEGFR2 can be located in hippocampal neuron PSDs (Fig 7A), suggesting its contribution in the regulation of synaptic transmission through postsynaptic mechanisms. Therefore, it is possible that VEGFR2 activation by VEGF in PSD promotes the maintenance and/or targeting of NMDAR2B to the PSD. Clearly these biochemical findings revealed that PSD enrichment in NMDAR2B requires the co-activation of both VEGF and NMDA receptors (100% in control versus  $155.3 \pm 26.4$  with NMDA+VEGF, N=5 independent experiments,  $p < 0.05$ ) (Fig 7A, C) in agreement with the potentiation of NMDAR2B synaptic function upon electrical and VEGF stimulations.

#### **Up-regulation of synaptic plasticity markers with VEGF and NMDA receptor co-activation**

To understand the molecular mechanisms underlying this NMDAR2B targeting process, we first examined the signaling pathways activated by VEGF and NMDA combined treatment in the immediate vicinity of PSDs. Calcium influx through active NMDAR triggers CaMKII $\alpha$  translocation to postsynaptic sites, autophosphorylation of the kinase and its binding to the GluN2B subunit, which in turn regulates synaptic plasticity (Coultrap and Bayer 2012). In addition, CaMKII $\alpha$  indirect activation by PKC has recently been involved in the NMDAR trafficking to the membrane (Lan, Skeberdis et al. 2001; Yan, Xu et al. 2011). Thus, given the key role of CaMKII $\alpha$  in the postsynaptic expression and function of NMDAR2B, we analyzed the modulation of its expression and activation in PSDs purified from treated hippocampal cultures. Combined application of VEGF and NMDA, as well as single stimulations, resulted in a significant enhancement in CaMKII $\alpha$  expression in PSD, compared to control condition (100% in control versus  $214.3 \pm 34.1$  with VEGF, N=9-8  $p < 0.01$ ; 100% in control versus  $320.7 \pm 74.8$  with NMDA, N=9-8  $p < 0.01$ ; 100% in control versus  $406.5 \pm 108.7$  with NMDA+VEGF, N=9-9  $p < 0.01$ ) (Fig 8A). A trend toward a progressive increase in CaMKII $\alpha$  translocation to PSD was detected from smaller values with VEGF stimulation (a 2 fold increase) to larger values with the combined VEGF and NMDA receptor activation (a 4 fold increase) (Fig 8A, bottom panel). Therefore, CaMKII $\alpha$  recruitment to PSD can occur via the activation of VEGF receptors independently of NMDAR contribution. However, VEGF stimulation alone is not able to change the level of CaMKII $\alpha$  autophosphorylation (at Thr286) in PSD, suggesting that the kinetic of

CaMKII $\alpha$  activation by VEGF requires more than 15 minutes in hippocampal neurons, as previously reported (Kim, Choi et al. 2008). Alternatively, given that CaMKII $\alpha$  is able to bind the GluN2B subunit of NMDAR independently of its autophosphorylation status (Yan, Xu et al. 2011), the activation of VEGF receptors can participate in the stabilization of postsynaptic NMDAR2B. The autophosphorylated form of CaMKII $\alpha$  accumulated in PSD only with NMDA treatment (4 fold increase, 100% in control versus  $408.8 \pm 87.8$  with NMDA, N=9-8 p<0.01) or combined VEGF and NMDA treatments (6 fold increase, 100% in control versus  $634.5 \pm 189.7$  with NMDA+VEGF, N=9-9 p<0.01) (Fig 8A, bottom panel). Thus, our data confirmed that NMDAR activation is instrumental to the CaMKII $\alpha$  autophosphorylation process, in agreement with numerous previous studies (Strack and Colbran 1998). They further showed that combined activation of VEGF and NMDA receptors did not significantly induce a greater effect than NMDA stimulation alone.

Next, we immunoblotted total hippocampal lysates to examine the contribution of 3 main signaling pathways that are known to be activated by VEGF in other systems (Cross, Dixelius et al. 2003). Among those, the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) and phospholipase C-gamma (PLC $\gamma$ ) are activated downstream of VEGF in hippocampal neurons, but with different kinetics (Kim, Choi et al. 2008). None of the treatments performed on hippocampal neurons had a significant effect on the expression of the phosphorylated forms of Src (Y416) or PI3K (Y458) compared to control condition (Fig 8B). In contrast, the activated form of PLC $\gamma$  identified by immunoblotting hippocampal lysates with an antibody for the phosphorylated tyrosine 783, was significantly increased with combined VEGF and NMDA stimulation compared to control condition (100% in control versus  $154.8 \pm 14.6$  with NMDA+VEGF, N=7\_7, p<0.05) (Fig 8B). VEGF or NMDA stimulation alone failed to induce a change in PLC $\gamma$  phosphorylation (Fig 8B). Taken together our data indicate that only the acute co-activation of VEGF and NMDA receptors can trigger signaling through the CaMKII and PLC $\gamma$ -PKC pathways, suggesting a requirement of both pathways in the VEGF dependent up-regulation of NMDAR-mediated synaptic transmission.

Activation of these two signaling pathways is known to independently induce insertion of GluA1 expressing AMPA receptors (GluA1-AMPA) into the synapse (Hayashi, Shi et al. 2000; Caldeira, Melo et al. 2007). Therefore, we further explored whether VEGF and NMDA combined stimulation is able to promote an enrichment of AMPA receptors at synaptic sites.

Surface immunostaining of the GluA1 subunit performed with a selective labeling of synaptic sites allowed us to quantify the effect of each treatment on the synaptic insertion of GluA1-AMPA in hippocampal neurons. In agreement with our previous findings, synaptic sites visualized with a co-localization of synapsin and PSD95 increased significantly in number upon combined VEGF and NMDA treatment (Fig 8C). In addition, the total amount of surface GluA1 was up-regulated with the same treatment ( $100\% \pm 9.9$  in control versus  $164.1 \pm 23.6$  with NMDA+VEGF,  $N=7-4$ ,  $p<0.05$ ), indicating an insertion of new GluA1-AMPA into the membrane and/or a stabilization of the receptors already present (Fig 8C). To determine whether this increased pool of GluA1-AMPA was targeted to synapses, we quantified the co-localization of PSD95 or synapsin-1 with GluA1 clusters. The results showed that upon co-activation of VEGF and NMDA receptors, a larger fraction of the GluA1 clusters were associated with PSD95 or synapsin immunopositive clusters ( $100\% \pm 14.8$  in control versus  $236.9 \pm 22.3$  with NMDA+VEGF,  $N=7-4$ ,  $p<0.05$ ) (Fig 8C), consistent with an increased amount of surface GluA1 at postsynaptic sites.

Altogether our findings demonstrated that mechanisms known to be required in synaptic plasticity, namely the activation of CaMKII and the synaptic insertion of GluA1-AMPA (Hayashi, Shi et al. 2000; Lisman, Yasuda et al. 2012), underlie the effect induced by the combined VEGF and NMDA stimulation of hippocampal neurons.

### **Co-activation of VEGF and NMDA receptors results in morphological changes of postsynaptic densities**

Many groups have reported structural modifications of synapses upon induction of long-term potentiation (LTP), a major form of synaptic plasticity, in the hippocampus (Geinisman 2000; Toni, Buchs et al. 2001). Of special interest are the changes in PSD size and in the proportion of perforated synapses. To examine whether combined VEGF and NMDA stimulation leads to a significant structural remodeling of synapses, we quantitatively assess these two parameters with electron microscopy. We selected postsynaptic regions obtained from hippocampal neurons exposed to different stimulations which displayed a characteristic prominent thickening well known as PSD (Figure 9). Quantitative analysis of PSD size revealed that PSD area was larger in combined treatment and stimulation with NMDA alone compared to the other conditions (NMDA+VEGF  $32574 \text{ nm}^2 \pm 2302$  vs Control  $17064 \text{ nm}^2 \pm 1256$ ,  $P<0.05$   $N=32-35$ ; NMDA+VEGF  $32574 \text{ nm}^2 \pm 2302$  vs VEGF  $15731 \text{ nm}^2 \pm 1306$ ,  $P<0.05$   $N=32-38$ ; NMDA  $32212$

$\text{nm}^2 \pm 2969$  vs Control  $17064 \text{ nm}^2 \pm 1256$ ,  $P < 0.05$   $N = 39-35$ ; NMDA  $32212 \text{ nm}^2 \pm 2969$  vs VEGF  $15731 \text{ nm}^2 \pm 1306$ ,  $P < 0.05$   $N = 39-38$ ). Thus, only the hippocampal neurons exposed to a stimulation including NMDA displayed an enlargement of their PSD. Therefore, these changes in structure of synapses could reflect an NMDAR-dependent increase in PSD area. In addition, we quantified the proportion of synapses characterized by a discontinuous PSD profile, known as perforated synapse, in sections from each of the groups. We observed an increase in the number of perforated PSD only in the combined stimulation condition. These results indicated that only the co-activation of VEGF and NMDA receptors resulted in an increased ratio of perforated to non-perforated synapses.



## DISCUSSION

In this study we demonstrated for the first time that VEGF is able to increase the NMDAR-dependent synaptic transmission in hippocampal pyramidal cells via VEGFR2-mediated postsynaptic mechanisms. Based on combined electrophysiological, immunocytochemical, biochemical, and ultrastructural approaches we analyzed the synaptic basis of the VEGF action on hippocampal neurons. Our immunohistochemical study confirmed previous findings showing that the VEGF receptor VEGFR2 is expressed by pyramidal cells from CA3 and CA1 regions in the hippocampus (Yang, Zhang et al. 2003). Moreover, we showed a complementary VEGF expression pattern in both regions, suggesting a role for the VEGF/VEGFR2 signaling pathway in hippocampal CA1 and CA3 networks. Electrophysiological data showed that VEGF is able to rapidly increase NMDAR-mediated evoked neurotransmission in hippocampal CA1 and CA3 pyramidal cells. In addition, application of a paired pulse facilitation protocol combined with the use of selective antagonists indicated a postsynaptic contribution of GluN2B expressing NMDA receptors (NMDA2B). We further provided several lines of evidence indicating that co-stimulation of hippocampal neurons with NMDA and VEGF triggers an increase in number of synaptic sites together with a relocation of NMDAR2B at synapses. First, our results from immunostainings showed an increased expression of synaptic sites and synaptic NMDAR2B with co-stimulation. Second, a biochemical strategy indicated that co-stimulation triggers enrichment in postsynaptic NMDAR2B with a translocation of autonomous CaMKII to postsynaptic densities (PSDs). Third, these remodeling of NMDAR synaptic content were paralleled with ultrastructural changes in PSDs, including their size and fenestrated type. Overall, these findings demonstrate the VEGF impact on the function and organization of hippocampal excitatory synapses in link with coincident activation of VEGF and NMDA receptors.

In a recent study, we documented a VEGF/NMDAR link in cerebellar neuronal guidance before synapse formation that raised questions about its contribution in neurotransmission (Meissirel, Ruiz de Almodovar et al. 2011). Previous studies have reported that VEGF can regulate the activity of ion channels in endothelial and heterologous cells, by activating  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channels (Faehling, Koch et al. 2001) and transient receptor potential



channels (TRPC) through VEGFR2 (Pocock, Foster et al. 2004; Cheng, James et al. 2006). In hippocampal neurons, VEGF might affect neuronal excitability by inducing voltage-gated  $\text{Na}^+$  channel inactivation via VEGFR2 signaling (Sun and Ma 2013). Additional inhibitory effects of VEGF have been documented in hippocampal neurons both on high-voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (Ma, Li et al. 2009) and outward delayed-rectifier  $\text{K}^+$  channels (Xu, Zheng et al. 2003), the latter of which are involved in membrane repolarization and impact on the shape and duration of action potentials. This VEGF-dependent inhibition of delayed-rectifier  $\text{K}^+$  channels has been linked to neuroprotective activity against cell death resulting from ischemic injury (Qiu, Zhang et al. 2003). Together these studies indicate that VEGF is capable of modulating neurotransmission. Various VEGF effects on synaptic transmission were documented in hippocampal and motor neurons, in which VEGF either suppressed evoked excitatory synaptic inputs (McCloskey, Croll et al. 2005; McCloskey, Hintz et al. 2008; Cammalleri, Martini et al. 2011) or increased spontaneous and evoked synaptic transmission (Kim, Choi et al. 2008; Huang, Yang et al. 2010) depending on conditions. These controversial effects led us to investigate the impact of VEGF on the modulation of NMDAR-mediated synaptic transmission. Here we show for the first time that VEGFR2 are localized at the postsynaptic membrane of hippocampal excitatory synapses, in postsynaptic densities, with NMDAR2B and the PSD95 scaffolding protein. These findings with the demonstration that the GluN2B subunit interacts with the VEGFR2 extracellular domain in heterologous cells suggest that VEGF/VEGFR2 and glutamate coincident signals contribute to the function of hippocampal excitatory synapses. Electrophysiological experiments revealed that local VEGF stimulation coincident with evoked afferent activity triggers a rapid potentiation of NMDAR-mediated synaptic responses in CA1 and CA3 hippocampal pyramidal cells. Thus, these results provided evidence that VEGF plays a key role in enhancing glutamatergic transmission mediated by NMDAR. Importantly, this potentiating effect of VEGF strictly depends on the local and timely exposure to VEGF in slices because a previous study reported that bath application of VEGF triggers an opposite effect (Cammalleri, Martini et al. 2011). Moreover, VEGFR2 expression in pyramidal cells appears to be critical for this VEGF-dependent effect because selective deletion of VEGFR2 in neural cells prevented the resulting potentiation of NMDAR-mediated synaptic transmission. However, we cannot exclude the possibility of an indirect effect of VEGF via astrocytes. Such a scenario is highly unlikely given the prominent VEGFR1 expression in these glial cells (Wittko-Schneider, Schneider et al. 2013) that is not targeted by the VEGFR2 deletion. Alternatively, the VEGFR2

co-receptors Neuropilin-1 and Neuropilin-2 previously documented in developing and adult hippocampal dendrites and synapses (Sahay, Kim et al. 2005; Bouzioukh, Daoudal et al. 2006; Tran, Rubio et al. 2009), may contribute to this VEGF-dependent effect. Our findings that VEGF is not affecting the PPF nor the  $1/CV^2$  ratios support a mechanism in which VEGF/VEGFR2 signaling increases NMDAR postsynaptic responsiveness in hippocampal pyramidal cells.

One potential mechanism responsible for the potentiation of NMDAR-mediated postsynaptic responses could be a VEGF-dependent increase in targeting and/or stabilization of NMDAR at synapses. Previous evidence indicated that the GluN2B/GluN2A ratio decreases during development in cultured hippocampal neurons (Groc, Heine et al. 2006; Thomas, Miller et al. 2006) in which only 21% of NMDAR2B are located at synapses at P15, with a lower residency time compared to NMDAR2A (Groc, Heine et al. 2006). Therefore, NMDAR2A are good candidates to participate in mediating the increase in NMDAR synaptic responses due to VEGF. However, our electrophysiological experiments with selective antagonists demonstrated that NMDAR2B is the major contributor to this postsynaptic effect. These results prompted us to examine the impact of coincident VEGF and NMDA receptor activation on the distribution of surface NMDAR2B in cultured hippocampal neurons. Control experiments verified that bath applications of VEGF or NMDA alone, or in a combined manner, did not affect hippocampal cell survival. Surface immunostainings further revealed that combined VEGF and NMDA stimulation lead to an increase in the number of synaptic sites, which depends on endogenous VEGFR2 expression in pyramidal cells, challenged with shRNA silencing. Moreover this formation of new synaptic sites was coupled with a synaptic enrichment in NMDAR2B that we confirmed with biochemical data. Thus, these findings indicate that coincident activation of VEGF and NMDA receptors in hippocampal pyramidal cells is able to initiate the development of new synaptic sites characterized by the recruitment of NMDAR2B. These results are in agreement with the potentiating effect of VEGF we reported on the evoked NMDAR2B responses in these neurons. A link between synapse formation and NMDAR2B expression has been demonstrated in studies showing that GluN2B silencing in hippocampal slices or in vivo in mice caused a reduced spine density in the hippocampus (Akashi, Kakizaki et al. 2009; Gambrill and Barria 2011). In line with these previous reports, our data indicate that NMDAR2B are targeted to new synapses and extend these findings by showing the

involvement of VEGF in this process.

It is important to note that although NMDAR2B insertion at synapses is constitutive and independent of glutamatergic synaptic activity (Barria and Malinow 2002), their synaptic anchorage is maintained through phosphorylation processes and interactions with PDZ domain containing proteins, including PSD95 (Prybylowski, Chang et al. 2005; Al-Hallaq, Conrads et al. 2007; Chen and Roche 2007). Consistent with a role of PSD95 in the maintenance of synaptic NMDAR2B, we observed a concurrent increase in the expression of this scaffolding protein and of NMDAR2B in Post-synaptic Densities (PSDs) upon VEGF and NMDA combined stimulation. Additional interactions may facilitate synaptic retention of NMDAR2B, including CaMKII-GluN2B interactions, resulting from an activity-triggered translocation of the enzyme to synapses (Shen and Meyer 1999; Bayer, De Koninck et al. 2001) where it specifically interacts with the C terminus of GluN2B subunits (Bayer, De Koninck et al. 2001; Bayer, LeBel et al. 2006). Thus, persistent activation of CaMKII upon association to GluN2B (Bayer, LeBel et al. 2006) could facilitate CaMKII-dependent phosphorylation of the scaffolding protein PSD95 and allow the formation of CaMKII-NMDAR2B-PSD95 synaptic complexes (Gardoni, Polli et al. 2006). We found that NMDA stimulation combined or not with VEGF, produced an increase in the content of the autonomous active form of CaMKII at PSDs, which may initiate the association of postsynaptic PSD95 with CaMKII-NMDAR2B in a ternary-molecular complex. In addition, further biochemical experiments allowed us to gain insight into an alternative signaling pathway specifically activated by the combined VEGF and NMDA stimulation. Our results revealed that this combined stimulation increased the activation of Phospholipase C  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), which acts upstream of Protein Kinase C, a kinase known to promote the delivery of new functional NMDAR to the membrane and to enhance NMDAR mediated responses (Lan, Skeberdis et al. 2001; Yan, Xu et al. 2011). Thus, our results raise the possibility that sequential activation of PLC $\gamma$ /PKC cascade and CaMKII could contribute to the increase in synaptic targeting and/or stabilization of NMDAR2B in cultured hippocampal neurons upon VEGF and NMDA stimulation. Consistent with a timely activation of these kinases, VEGF-dependent activation of PLC $\gamma$  was previously reported to be rapid in hippocampal neurons, occurring prior to the activation of CaMKII (Kim, Choi et al. 2008). However, in contrast to this last study, we didn't observe an activation of PLC $\gamma$  and CaMKII with VEGF alone but

demonstrated a VEGF-dependent translocation of CaMKII to PSDs. These discrepancies may result from the kinetics of kinase activation by VEGF, with PLC $\gamma$  activation peaking between 5 and 10 min whereas CaMKII activation reaches a maximum at 30 min (Kim, Choi et al. 2008). In the present study, 15 min treatments were applied to obtain their maximum impact as documented with our electrophysiological experiments. Our findings support a model in which coincident activation of VEGF and NMDA receptors activates both PLC $\gamma$  and CaMKII signaling pathways that trigger formation of new synaptic sites with functional NMDAR2B and potentiation of NMDAR2B mediated synaptic responses.

NMDAR-mediated activation and translocation of CaMKII at excitatory glutamatergic synapses is a key step for inducing structural and functional modification of activated synapses, underlying the induction of long term potentiation (LTP) (Lisman, Yasuda et al. 2012). Moreover, the CaMKII-GluN2B interaction allowing a persistent activation of the kinase is clearly relevant for LTP induction (Barria and Malinow 2005; Sanhueza and Lisman 2013) and could also promote the delivery of new functional AMPA receptors to synapses (Malinow and Malenka 2002; Brecht and Nicoll 2003; Lu, Isozaki et al. 2010). The GluA1 subunit of AMPA receptors is a critical component involved in the activity-dependent trafficking of AMPA receptors (Hayashi, Shi et al. 2000; Lin, Makino et al. 2009). Consequently, the link we reported between the increased translocation of active CaMKII to PSD and the postsynaptic enrichment in NMDAR2B upon VEGF and NMDA combined stimulation, could be associated with membrane insertion and/or synaptic targeting of GluA1 expressing AMPA receptor. Specifically we showed that combined VEGF and NMDA application triggered an increase in GluA1 surface expression and facilitated the synaptic insertion of GluA1 expressing AMPA receptors. These observations suggest that coincident activation of VEGF and NMDA receptors in hippocampal neurons triggers a cascade of signaling events leading to the expression of synaptic plasticity markers, namely the CaMKII translocation and activation pattern in PSD and the delivery of new synaptic AMPA receptors. In addition, previous reports showed that increased AMPA delivery and insertion at synapses or LTP induction could have morphological consequences on synaptic structure with the occurrence of synapses bearing perforated postsynaptic densities (Toni, Buchs et al. 2001). Here, we identified morphological changes of PSDs at the ultrastructural level due to combined stimulation of cultured hippocampal

neurons with VEGF and NMDA, with an increased proportion of enlarged and perforated PSDs.

In summary, our findings support the view that synaptic membrane remodeling is occurring concurrently with a change in synaptic receptor content triggered by coincident VEGF and glutamate signals. They are providing new insight into the impact of VEGF on glutamatergic synaptic function and morphology and further delineate a molecular basis underlying a direct action of VEGF on hippocampus-dependent form of learning and memory.

## REFERENCES

- Akashi, K., T. Kakizaki, et al. (2009). "NMDA receptor GluN2B (GluR epsilon 2/NR2B) subunit is crucial for channel function, postsynaptic macromolecular organization, and actin cytoskeleton at hippocampal CA3 synapses." *J Neurosci* **29**(35): 10869-10882.
- Al-Hallaq, R. A., T. P. Conrads, et al. (2007). "NMDA di-heteromeric receptor populations and associated proteins in rat hippocampus." *J Neurosci* **27**(31): 8334-8343.
- Barria, A. and R. Malinow (2002). "Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses." *Neuron* **35**(2): 345-353.
- Barria, A. and R. Malinow (2005). "NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII." *Neuron* **48**(2): 289-301.
- Bayer, K. U., P. De Koninck, et al. (2001). "Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation." *Nature* **411**(6839): 801-805.
- Bayer, K. U., E. LeBel, et al. (2006). "Transition from reversible to persistent binding of CaMKII to postsynaptic sites and NR2B." *J Neurosci* **26**(4): 1164-1174.
- Bhattacharyya, S., V. Biou, et al. (2009). "A critical role for PSD-95/AKAP interactions in endocytosis of synaptic AMPA receptors." *Nat Neurosci* **12**(2): 172-181.
- Bliss, T. V. and G. L. Collingridge (2013). "Expression of NMDA receptor-dependent LTP in the hippocampus: bridging the divide." *Mol Brain* **6**: 5.
- Bouzioukh, F., G. Daoudal, et al. (2006). "Semaphorin3A regulates synaptic function of differentiated hippocampal neurons." *Eur J Neurosci* **23**(9): 2247-2254.
- Bredt, D. S. and R. A. Nicoll (2003). "AMPA receptor trafficking at excitatory synapses." *Neuron* **40**(2): 361-379.
- Caldeira, M. V., C. V. Melo, et al. (2007). "Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression and synaptic delivery of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits in hippocampal neurons." *J Biol Chem* **282**(17): 12619-12628.
- Cammalleri, M., D. Martini, et al. (2011). "Vascular endothelial growth factor up-regulation in the mouse hippocampus and its role in the control of epileptiform activity." *Eur J Neurosci* **33**(3): 482-498.
- Cao, L., X. Jiao, et al. (2004). "VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory." *Nat Genet* **36**(8): 827-835.
- Chen, B. S. and K. W. Roche (2007). "Regulation of NMDA receptors by phosphorylation." *Neuropharmacology* **53**(3): 362-368.
- Cheng, H. W., A. F. James, et al. (2006). "VEGF activates receptor-operated cation channels in human microvascular endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(8): 1768-1776.
- Coultrap, S. J. and K. U. Bayer (2012). "CaMKII regulation in information processing and storage." *Trends Neurosci* **35**(10): 607-618.
- Cross, M. J., J. Dixelius, et al. (2003). "VEGF-receptor signal transduction." *Trends Biochem Sci* **28**(9): 488-494.
- Dosemeci, A., A. J. Makusky, et al. (2007). "Composition of the synaptic PSD-95 complex." *Mol Cell Proteomics* **6**(10): 1749-1760.
- During, M. J. and L. Cao (2006). "VEGF, a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis." *Curr Alzheimer Res* **3**(1): 29-33.

- El Gaamouch, F., A. Buisson, et al. (2012). "Interaction between alphaCaMKII and GluN2B controls ERK-dependent plasticity." *J Neurosci* **32**(31): 10767-10779.
- Faehling, M., E. D. Koch, et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor-A activates Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in human endothelial cells in culture." *Int J Biochem Cell Biol* **33**(4): 337-346.
- Gambrill, A. C. and A. Barria (2011). "NMDA receptor subunit composition controls synaptogenesis and synapse stabilization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(14): 5855-5860.
- Gardoni, F., F. Polli, et al. (2006). "Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation modulates PSD-95 binding to NMDA receptors." *Eur J Neurosci* **24**(10): 2694-2704.
- Geinisman, Y. (2000). "Structural synaptic modifications associated with hippocampal LTP and behavioral learning." *Cereb Cortex* **10**(10): 952-962.
- Groc, L., M. Heine, et al. (2006). "NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(49): 18769-18774.
- Haigh, J. J., P. I. Morelli, et al. (2003). "Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling." *Dev Biol* **262**(2): 225-241.
- Hayashi, Y., S. H. Shi, et al. (2000). "Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction." *Science* **287**(5461): 2262-2267.
- Hoey, S. E., R. J. Williams, et al. (2009). "Synaptic NMDA receptor activation stimulates alpha-secretase amyloid precursor protein processing and inhibits amyloid-beta production." *J Neurosci* **29**(14): 4442-4460.
- Huang, Y. F., C. H. Yang, et al. (2010). "Pharmacological and genetic accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha enhances excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons through the production of vascular endothelial growth factor." *J Neurosci* **30**(17): 6080-6093.
- Jin, K., Y. Zhu, et al. (2002). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(18): 11946-11950.
- Jin, K. L., X. O. Mao, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18): 10242-10247.
- Kim, B. W., M. Choi, et al. (2008). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling regulates hippocampal neurons by elevation of intracellular calcium and activation of calcium/calmodulin protein kinase II and mammalian target of rapamycin." *Cell Signal* **20**(4): 714-725.
- Kornau, H. C., L. T. Schenker, et al. (1995). "Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95." *Science* **269**(5231): 1737-1740.
- Lan, J. Y., V. A. Skeberdis, et al. (2001). "Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating." *Nat Neurosci* **4**(4): 382-390.
- Licht, T., I. Goshen, et al. (2011). "Reversible modulations of neuronal plasticity by VEGF." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(12): 5081-5086.
- Licht, T. and E. Keshet (2013). "Delineating multiple functions of VEGF-A in the adult brain." *Cell Mol Life Sci* **70**(10): 1727-1737.
- Lin, D. T., Y. Makino, et al. (2009). "Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation." *Nat Neurosci* **12**(7): 879-887.
- Lisman, J., R. Yasuda, et al. (2012). "Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation." *Nat Rev Neurosci* **13**(3): 169-182.



- Lu, W., K. Isozaki, et al. (2010). "Synaptic targeting of AMPA receptors is regulated by a CaMKII site in the first intracellular loop of GluA1." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(51): 22266-22271.
- Luscher, C. and R. C. Malenka (2012). "NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD)." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(6).
- Ma, Y. Y., K. Y. Li, et al. (2009). "Vascular endothelial growth factor acutely reduces calcium influx via inhibition of the Ca<sup>2+</sup> channels in rat hippocampal neurons." J Neurosci Res **87**(2): 393-402.
- Malinow, R. and R. C. Malenka (2002). "AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity." Annu Rev Neurosci **25**: 103-126.
- McCloskey, D. P., S. D. Croll, et al. (2005). "Depression of synaptic transmission by vascular endothelial growth factor in adult rat hippocampus and evidence for increased efficacy after chronic seizures." J Neurosci **25**(39): 8889-8897.
- McCloskey, D. P., T. M. Hintz, et al. (2008). "Modulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in motor neurons and its electrophysiological effects." Brain Res Bull **76**(1-2): 36-44.
- Meissirel, C., C. Ruiz de Almodovar, et al. (2011). "VEGF modulates NMDA receptors activity in cerebellar granule cells through Src-family kinases before synapse formation." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(33): 13782-13787.
- Navon, H., Y. Bromberg, et al. (2012). "Neuroprotection by NMDA preconditioning against glutamate cytotoxicity is mediated through activation of ERK 1/2, inactivation of JNK, and by prevention of glutamate-induced CREB inactivation." J Mol Neurosci **46**(1): 100-108.
- Neyton, J. and P. Paoletti (2006). "Relating NMDA receptor function to receptor subunit composition: limitations of the pharmacological approach." J Neurosci **26**(5): 1331-1333.
- Paoletti, P., C. Bellone, et al. (2013). "NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease." Nat Rev Neurosci **14**(6): 383-400.
- Pocock, T. M., R. R. Foster, et al. (2004). "Evidence of a role for TRPC channels in VEGF-mediated increased vascular permeability in vivo." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(3): H1015-1026.
- Prybylowski, K., K. Chang, et al. (2005). "The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2." Neuron **47**(6): 845-857.
- Qiu, M. H., R. Zhang, et al. (2003). "Enhancement of ischemia-induced tyrosine phosphorylation of Kv1.2 by vascular endothelial growth factor via activation of phosphatidylinositol 3-kinase." J Neurochem **87**(6): 1509-1517.
- Ruiz de Almodovar, C., C. Coulon, et al. (2010). "Matrix-binding vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms guide granule cell migration in the cerebellum via VEGF receptor Flk1." J Neurosci **30**(45): 15052-15066.
- Sahay, A., C. H. Kim, et al. (2005). "Secreted semaphorins modulate synaptic transmission in the adult hippocampus." J Neurosci **25**(14): 3613-3620.
- Sanhueza, M. and J. Lisman (2013). "The CaMKII/NMDAR complex as a molecular memory." Mol Brain **6**: 10.
- Schanzer, A., F. P. Wachs, et al. (2004). "Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor." Brain Pathol **14**(3): 237-248.



- Shen, K. and T. Meyer (1999). "Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation." Science **284**(5411): 162-166.
- Strack, S. and R. J. Colbran (1998). "Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl- D-aspartate receptor." J Biol Chem **273**(33): 20689-20692.
- Sun, G. C. and Y. Y. Ma (2013). "Vascular endothelial growth factor modulates voltage-gated Na(+) channel properties and depresses action potential firing in cultured rat hippocampal neurons." Biol Pharm Bull **36**(4): 548-555.
- Thomas, C. G., A. J. Miller, et al. (2006). "Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons." J Neurophysiol **95**(3): 1727-1734.
- Tillo, M., C. Ruhrberg, et al. (2012). "Emerging roles for semaphorins and VEGFs in synaptogenesis and synaptic plasticity." Cell Adh Migr **6**(6): 541-546.
- Toni, N., P. A. Buchs, et al. (2001). "Remodeling of synaptic membranes after induction of long-term potentiation." J Neurosci **21**(16): 6245-6251.
- Tran, T. S., M. E. Rubio, et al. (2009). "Secreted semaphorins control spine distribution and morphogenesis in the postnatal CNS." Nature **462**(7276): 1065-1069.
- Wittko-Schneider, I. M., F. T. Schneider, et al. (2013). "Brain homeostasis: VEGF receptor 1 and 2-two unequal brothers in mind." Cell Mol Life Sci **70**(10): 1705-1725.
- Xu, J. Y., P. Zheng, et al. (2003). "Vascular endothelial growth factor inhibits outward delayed-rectifier potassium currents in acutely isolated hippocampal neurons." Neuroscience **118**(1): 59-67.
- Yan, J. Z., Z. Xu, et al. (2011). "Protein kinase C promotes N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor trafficking by indirectly triggering calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) autophosphorylation." J Biol Chem **286**(28): 25187-25200.
- Yang, S. Z., L. M. Zhang, et al. (2003). "Distribution of Flk-1 and Flt-1 receptors in neonatal and adult rat brains." Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **274**(1): 851-856.

## LEGENDS TO THE FIGURES

**Figure 1 : VEGF AND FLK1 EXPRESSION IN HIPPOCAMPAL CA1 AND CA3 REGIONS.** Immunohistochemistry on P15 hippocampal coronal slices revealed the presence of both VEGF (in red) and Flk1 (in green) in CA1 (**A and B**) and in CA3 (**C and D**). VEGF and Flk1 are expressed in the stratum radiatum (SR) and pyramidale (SP) in CA1 (**A**) and CA3 (**C**). Note that the proximal part of the pyramidal apical dendrites expressed both VEGF and Flk1 in CA1 (**B**) and CA3 (**D**).

**Figure 2 : VEGF-INDUCED INCREASE IN NMDAR-MEDIATED SYNAPTIC TRANSMISSION IN HIPPOCAMPAL CA1 AND CA3 PYRAMIDAL CELLS.** **A)** Representative time course of the VEGF effect on NMDAR-mediated Excitatory Postsynaptic Currents (EPSCs) at Schaffer collateral-CA1 synapses, in baseline condition (1), after VEGF application (2), ifenprodyl (3) and MK801 (4) treatments. Note the enhancement of EPSCs in presence of VEGF and their blockade when the NMDAR antagonist ifenprodyl and the open blocker MK801 were applied **B)** Paired Pulse facilitation in CA1. Note that the magnitude of PPF characterized by PPF and  $1/CV^2$  ratios didn't change after VEGF application. **C)** Summary graph of the impact of VEGF on NMDAR-mediated responses in CA1 (N = 8), showing a 3 fold increase in the EPSC amplitude after VEGF local application **D)** Paired Pulse Facilitation in CA3. As previously reported for CA1, the magnitude of PPF didn't change after VEGF application. **E)** Representative time course of the VEGF effect on NMDAR-mediated EPSCs recorded in VEGFR2<sup>lox/-</sup> Cre<sup>+</sup> and VEGFR2<sup>lox/-</sup> Cre<sup>-</sup> mice. NMDAR EPSCs were characterized in Cre(-) (N=14) and Cre(+) (N=6) mice and expressed as normalized values. Note that VEGFR2 silencing prevent the VEGF-dependent increase in NMDAR mediated-synaptic transmission. Significant differences between conditions are indicated by (\*) for p<0.05; (\*\*) for p<0.01; (\*\*\*) for p<0.001.

**Figure 3: VEGF-DEPENDENT INCREASE IN NMDAR-MEDIATED SYNAPTIC RESPONSES INVOLVES NMDAR2B.** **A)** Contribution of GluN2 subunits to NMDAR-mediated EPSCs was characterized with selective GluN2B and GluN2A antagonists (respectively Ifenprodyl and NVP-AAM-077). EPSC amplitude was expressed as normalized values. GluN2A blockade, in contrast to GluN2B inhibition, failed to prevent the VEGF-dependent potentiation of NMDAR-mediated synaptic responses. Significant differences between conditions are indicated by (\*) for p<0.05. **B)** The Decay of NMDAR-mediated EPSCs was analyzed in presence of selective GluN2B and GluN2A

antagonists and expressed as normalized values **C)** Paired Pulse Facilitation was induced in presence of Ifenprodyl or NVP-AAM-077 **D)** VEGFR2 association with GluN2B: Total lysates of co-transfected HEK cells incubated with a recombinant form of VEGFR2 extracellular domain (left) were immunoprecipitated with anti-His coupled-microbeads (right) and immunoblotted for GluN1 (upper lane), GluN2B (middle lane) and VEGFR2 (bottom lane) ; N=2 independent experiments.

**Figure 4: IMPACT OF VEGF OR/AND NMDA TREATMENTS ON HIPPOCAMPAL CELL VIABILITY.** A fluorescent-based Live/Dead assay was used to identify live and dead cells with **green** calcein AM staining live cells and **red** EthD-1 labeling dead cells. Quantitative analyses normalized to the total cell number failed to detect any effect of the various treatments. N= 2 independent experiments.

**Figure 5 : COMBINED VEGF AND NMDA TREATMENT RESULTS IN SYNAPSE FORMATION AND NMDAR2B RECRUITMENT TO SYNAPSES. A-E)** Representative dendritic staining for GluN2B (green) (**A,D**), VEGFR2 (red) (**B,E**) and synapsin labeling (magenta) (**C, D, E**). Graphs showing GluN2B (**A**), VEGFR2 (**B**) and synapsin (**C**) cluster densities, as well as GluN2B/synapsin (**D**) and VEGFR2/synapsin (**E**) co-clusters densities. All values were normalized to control and represented as mean  $\pm$  SEM; N=17, 12, 10, 8 pyramidal cells respectively in control, VEGF, NMDA and NMDA+VEGF conditions. **A**, Note the significant decrease in density of surface GluN2B clusters with VEGF, NMDA and combined VEGF and NMDA treatment. **B**, Treatments didn't affect the density of surface VEGFR2 clusters. **C**, A significant increase in density of synapsin clusters resulted from the combined treatment. **D, E** The density of GluN2B and VEGFR2 clusters at synapses respectively increased with combined VEGF and NMDA treatments. Data are derived from 2 independent experiments. Significant difference between conditions are indicated by (\*) for  $p < 0.05$ ; (\*\*) for  $p < 0.01$ ; (\*\*\*) for  $p < 0.001$ .

**Figure 6 : VEGFR2 LOSS OF FUNCTION PREVENTS THE VEGF AND NMDA-INDUCED SYNAPSE FORMATION. A)** Western Blot showing a downregulation of VEGFR2 in HEK cells transfected with a shRNA construct for VEGFR2 (ShVEGFR2) but not in untransfected HEK cells or in HEK cells transfected with a scrambled ShRNA (ShScr). **B & C)** Quantitative analyses of GluN2B and Synapsin cluster densities in hippocampal cells transfected with ShScr or ShVEGFR2. Note that VEGFR2 silencing with ShVEGFR2 block the increase in synapse formation in response to the

treatments. All values were normalized to control and represented as mean  $\pm$  SEM, N=10, 19, 20, 22 pyramidal cells respectively in control, VEGF, NMDA and NMDA+VEGF conditions. Significant difference between conditions are indicating by (\*) for  $p<0.05$ ; (\*\*) for  $p<0.01$ ; (\*\*\*) for  $p<0.001$ .

**Figure 7 : POSTSYNAPTIC ENRICHMENT IN NMDAR2B AND PSD95 WITH CO-ACTIVATION OF VEGF AND NMDA RECEPTORS.** A) Representative Western Blots of isolated postsynaptic (PSD) and non-PSD fractions from hippocampal cells treated with respectively VEGF, NMDA or NMDA+VEGF. PSD and non-PSD fractions were immunoblotted for PSD95 (upper lane), GluN2B (middle lane) VEGFR2 (bottom lane). **B & C)** Semi-quantitative analyses showing respectively an increase in PSD95 (**B**) and GluN2B (**C**) content in PSD fractions derived from hippocampal cells exposed to NMDA+VEGF. All values were normalized to control and represented as mean  $\pm$  SEM. 10 independent experiments were performed in B and 5 in C. Significant differences between conditions are indicating by (\*) for  $p<0.05$ ; (\*\*) for  $p<0.01$ ; (\*\*\*) for  $p<0.001$ .

**Figure 8 : INDUCTION OF SYNAPTIC PLASTICITY MARKERS WITH CO-ACTIVATION OF VEGF AND NMDA RECEPTORS.** **A)** Western blot analysis of pT286-CaMKII (active) and total CaMKII expression in PSD fraction (N=10 independent experiments). Increase in CaMKII expression induced by VEGF, NMDA and NMDA+VEGF stimulations reflecting CaMKII translocation to PSD. Note the increase in PSD expression of active CaMKII upon NMDA and NMDA+VEGF application. Significant difference between conditions are indicating by (\*) for  $p<0.05$ ; (\*\*) for  $p<0.01$ ; (\*\*\*) for  $p<0.001$ . **B)** Western Blot analyses of activated signaling pathways upon the treatments. Total hippocampal lysates from cells exposed to control, VEGF, NMDA and NMDA+VEGF were immunoblotted for the total and active forms of Src, PI3K and PLC $\beta$ . Note the increase in expression of the active form of PLC $\beta$  upon exposition to the combined VEGF and NMDA treatment (N=16 for Src, N=6 for PI3K and N=7 for PLC $\beta$ ). Significant difference between conditions are indicating by (\*) for  $p<0.05$ ; (\*\*) for  $p<0.01$ ; (\*\*\*) for  $p<0.001$ . **C)** Combined VEGF and NMDA treatment triggered an increase in surface GluA1 expressing AMPAR and their recruitment to synapses. Representative dendritic staining for GluA1 (green) and synapsin labeling (magenta) are illustrated with graphs showing GluA1 cluster densities at the cell surface (left) and at synapses (right). All values were normalized to control and represented as mean  $\pm$  SEM, N=7, 10, 8, 4 pyramidal cells respectively in control, VEGF, NMDA

and NMDA+VEGF conditions. Data shown are derived from 2 independent experiments. Significant difference between conditions are indicating by (\*) for  $p<0.05$ ; (\*\*) for  $p<0.01$ ; (\*\*\*) for  $p<0.001$ .

**Figure 9 : ULTRASTRUCTURAL CHANGES OF POSTSYNAPTIC DENSITIES UPON VEGF AND NMDA RECEPTOR CO-ACTIVATION.** **A)** Photomicrographs illustrating synapses bearing typical thickening that characterizes PSDs. Note a synapse with perforated PSD representative of the combined VEGF and NMDA treatment. **B)** Quantitative analyses of synaptic profiles showing an increase in PSD area in NMDA and combined NMDA+VEGF stimulation compared to control and VEGF conditions. Significant difference between conditions are indicating by (\*) for  $p<0.05$ .

FIGURE 1

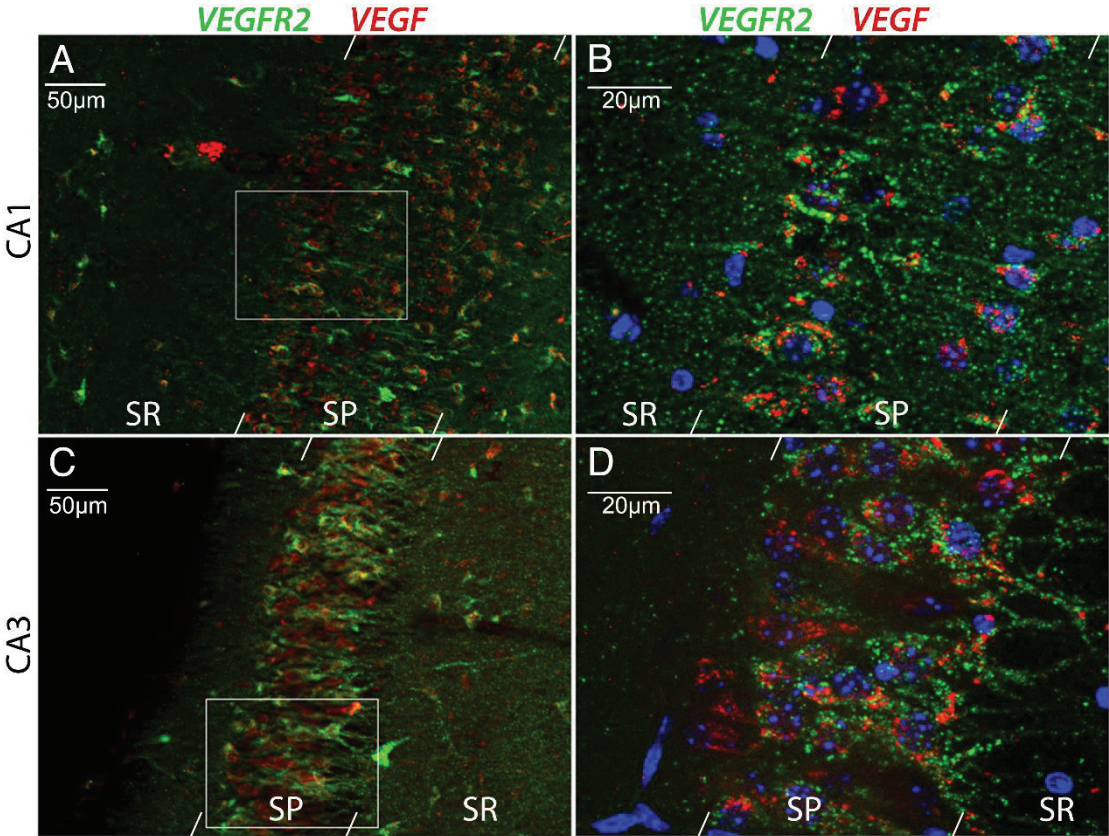




Figure 2

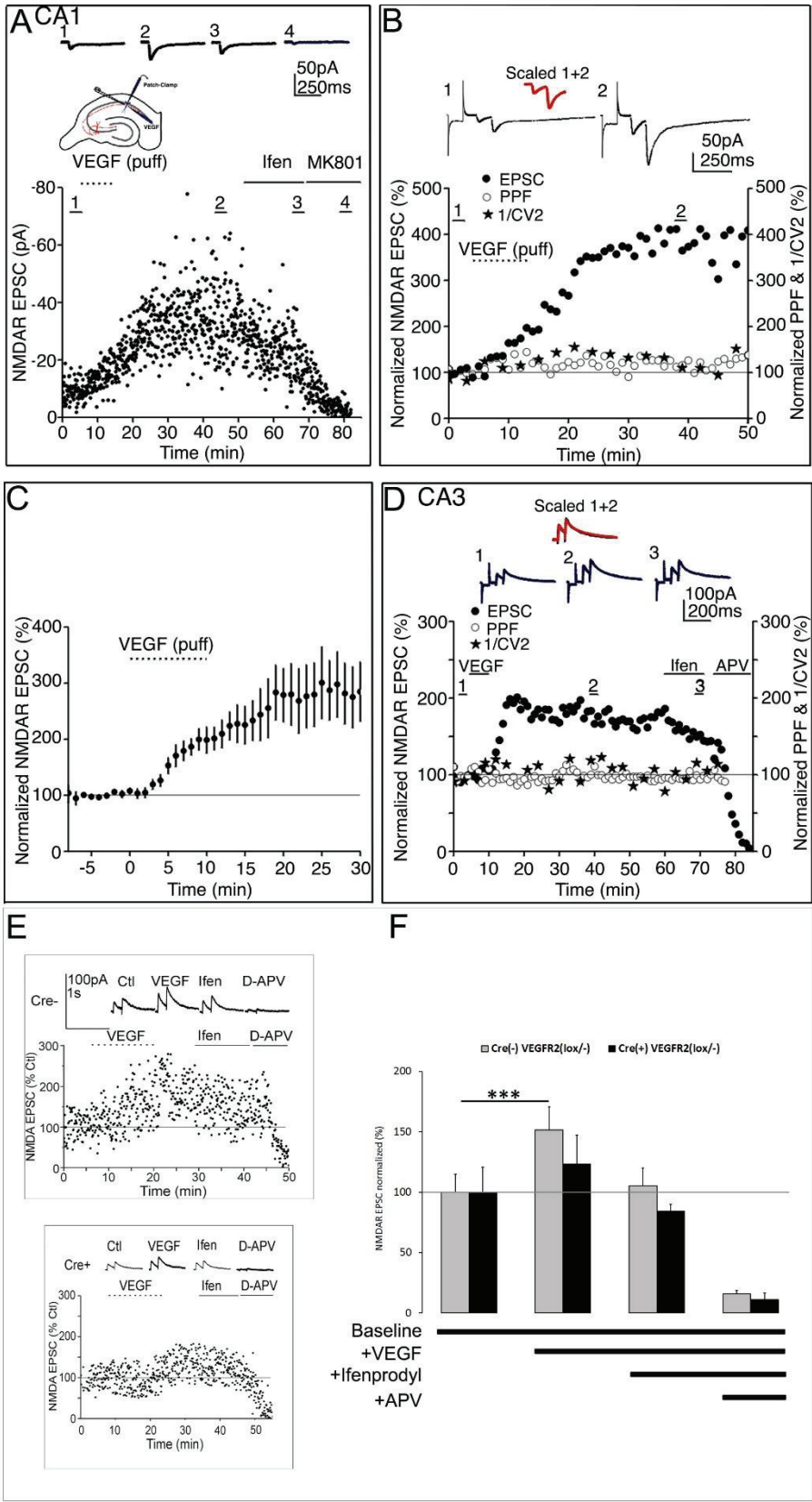


Figure 3

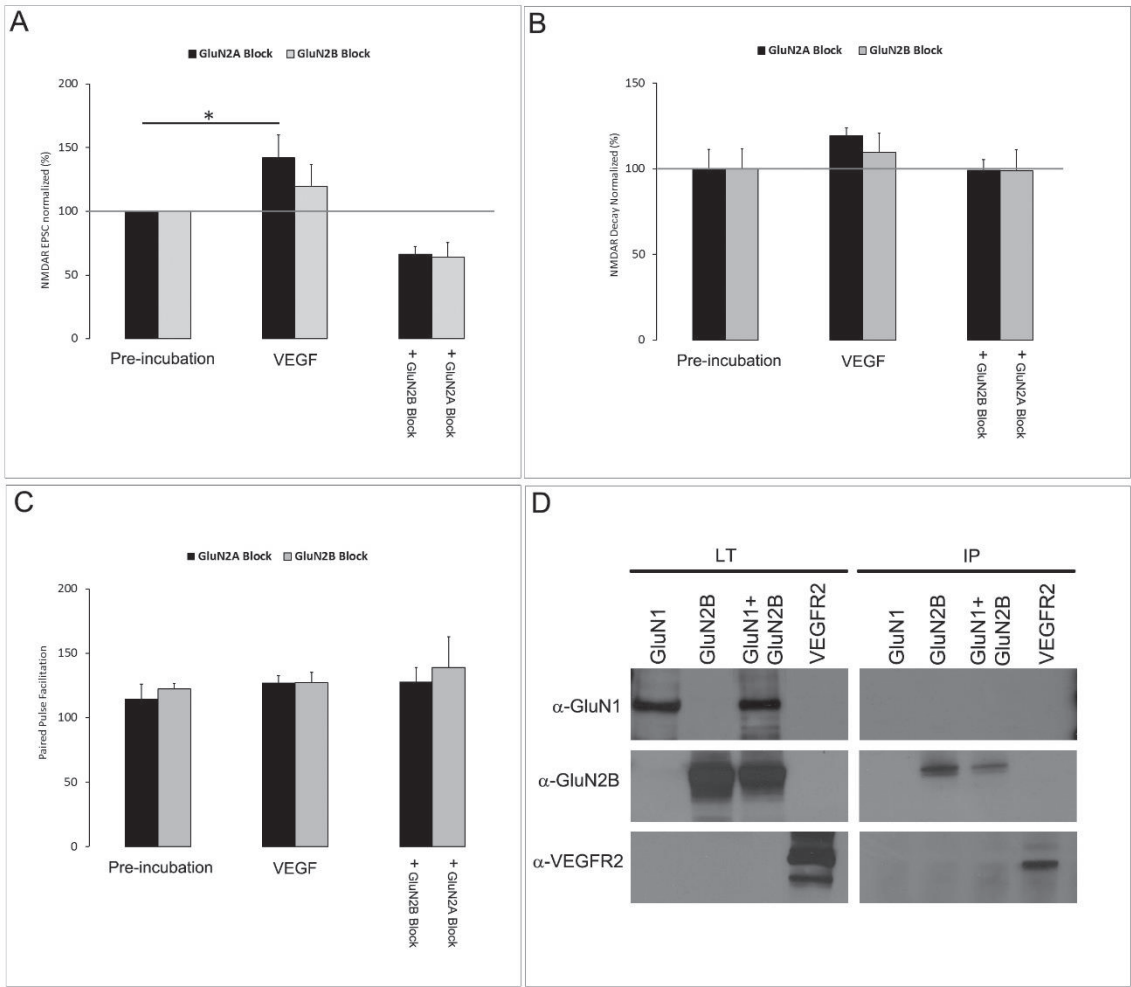




Figure 4

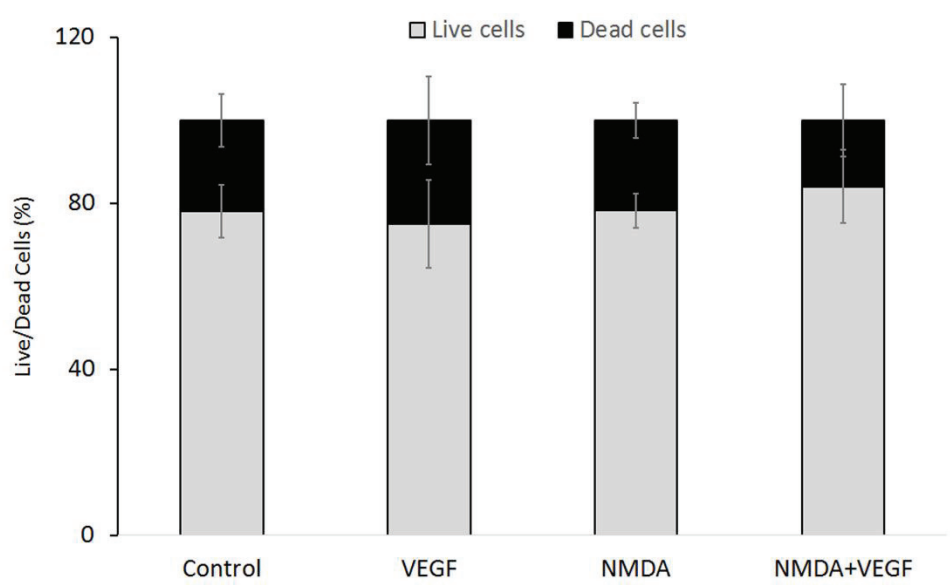
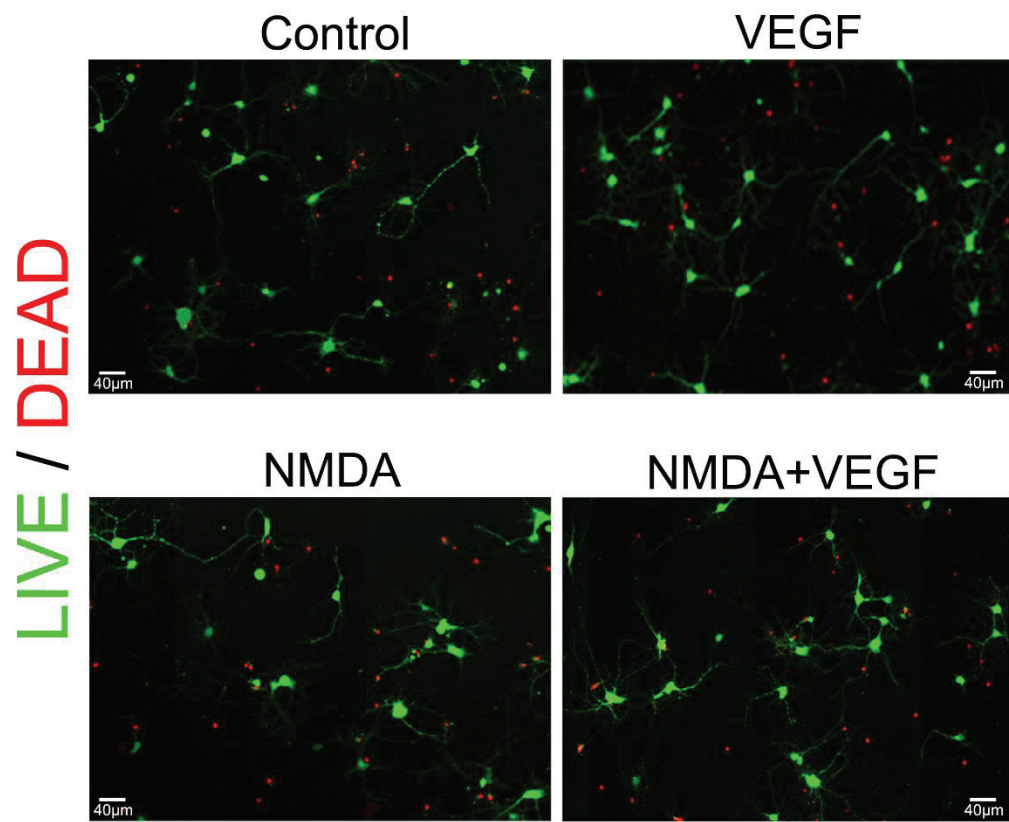


Figure 5

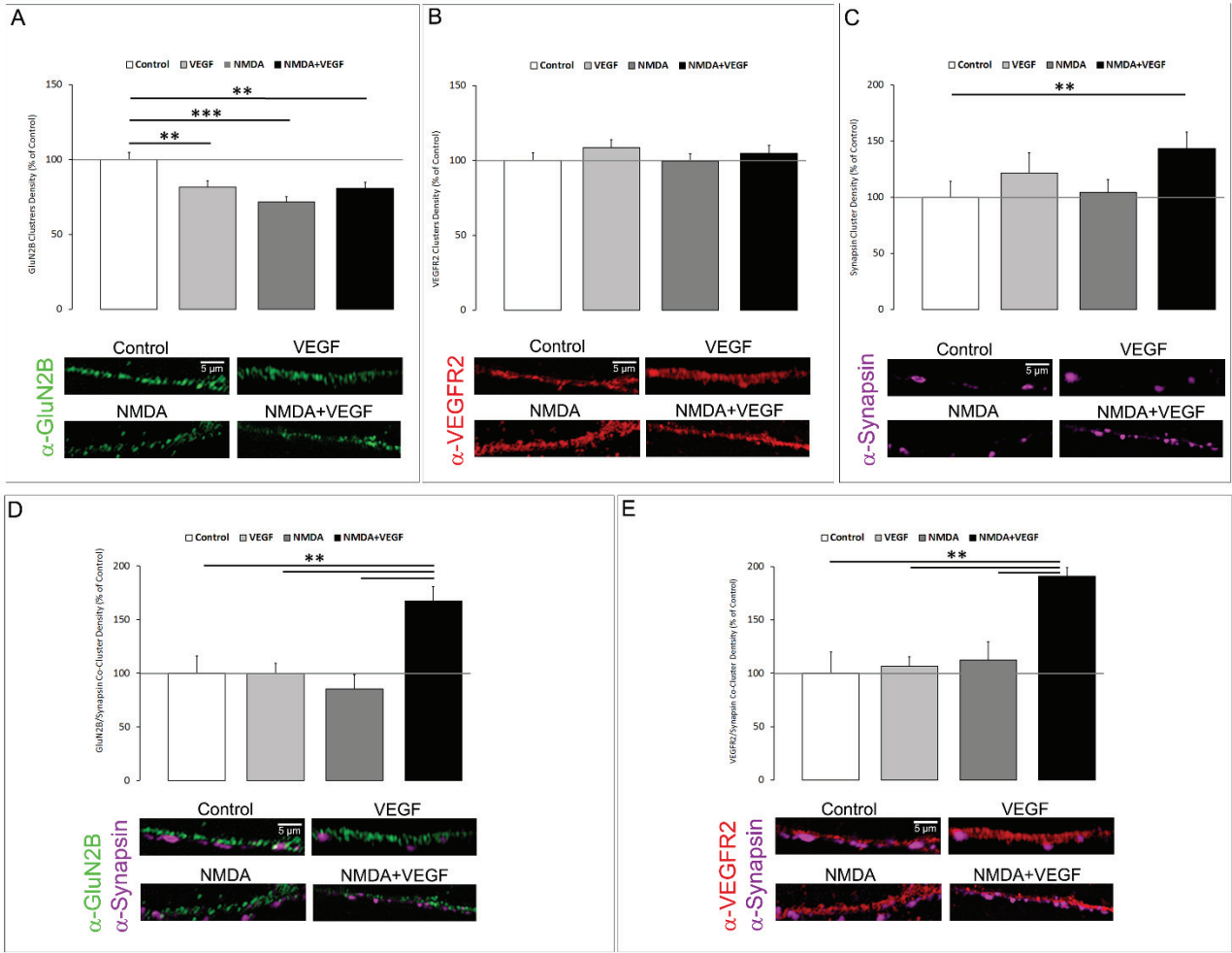


Figure 6

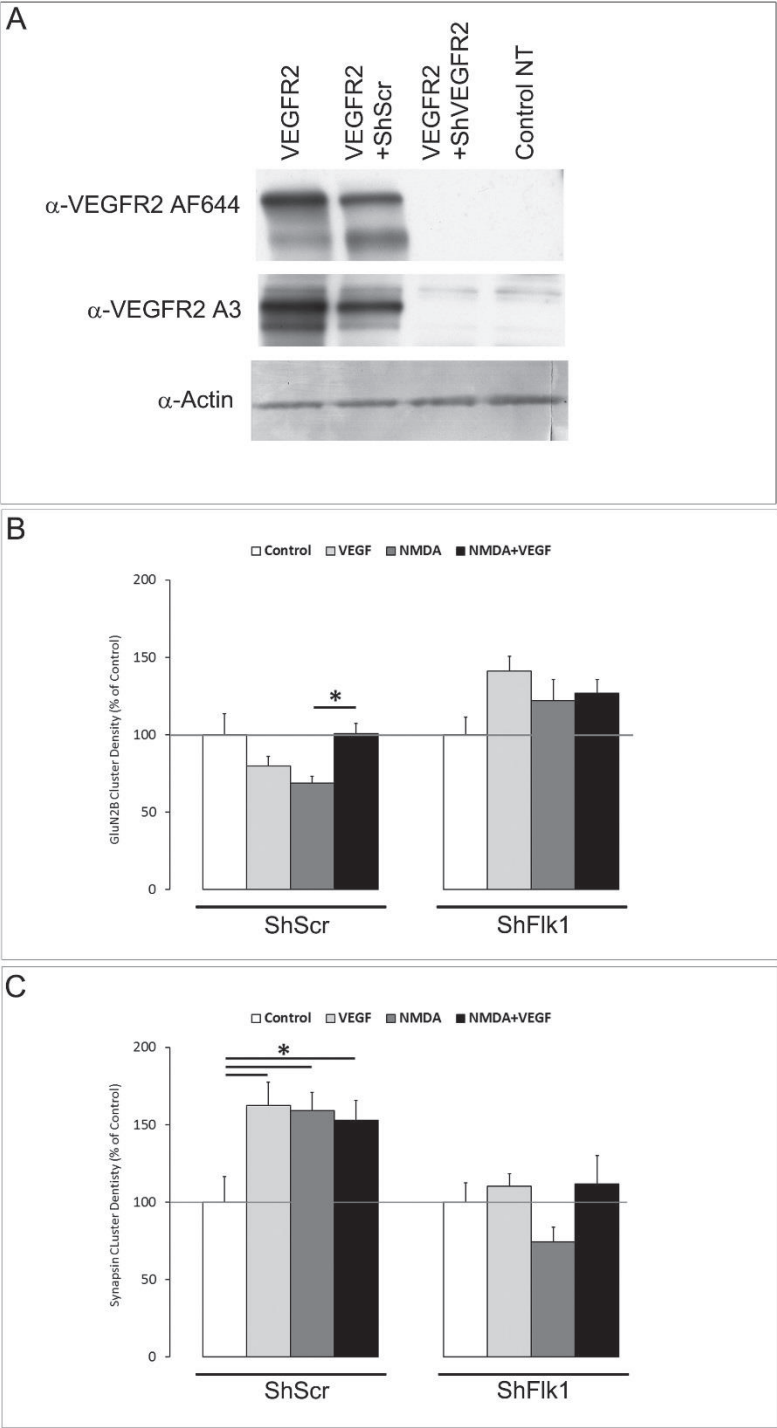
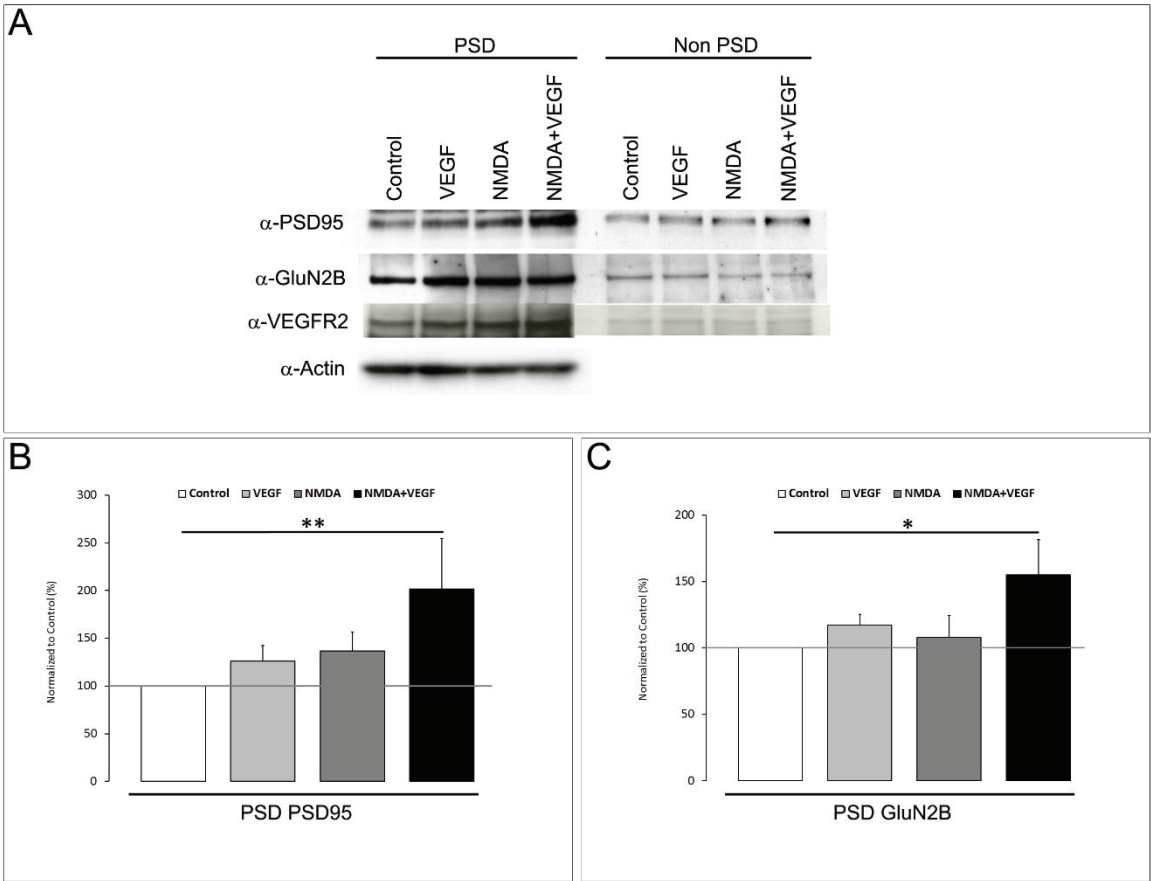


Figure 7



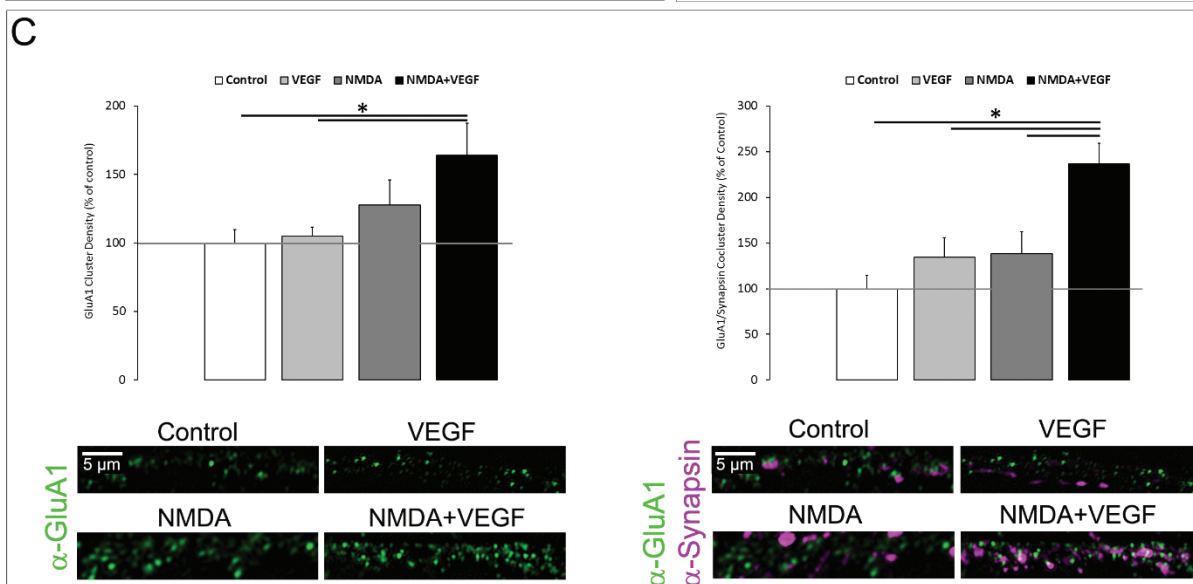
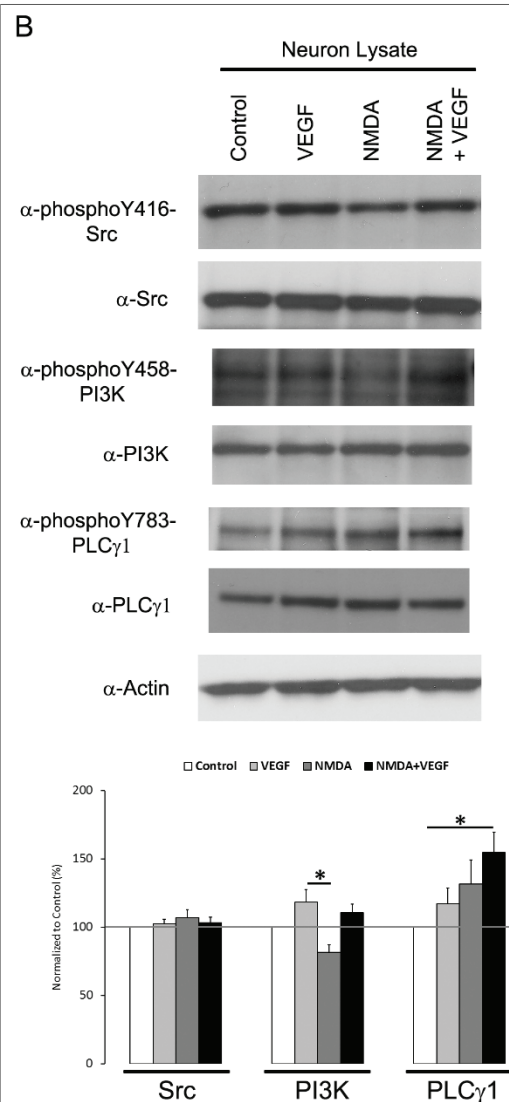
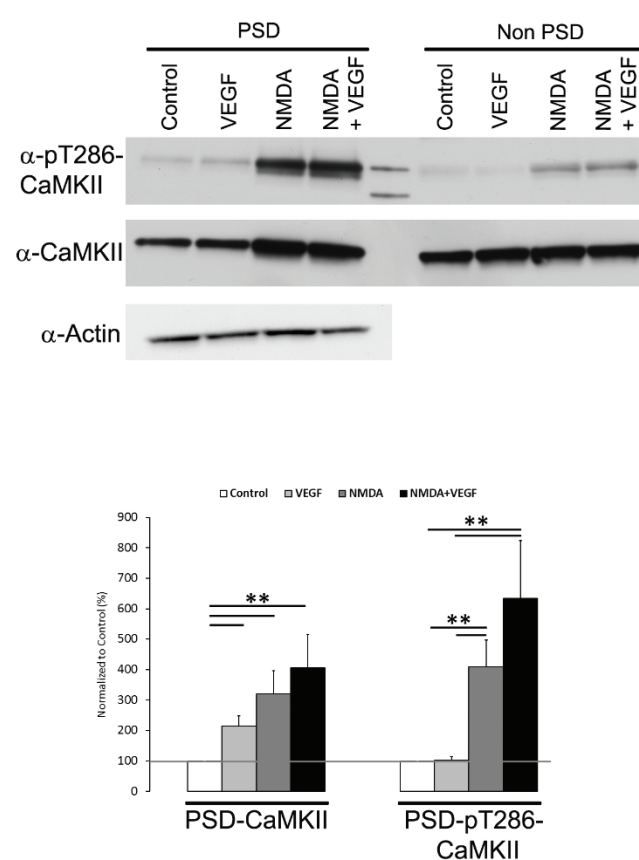
**Figure 8**

Figure 9

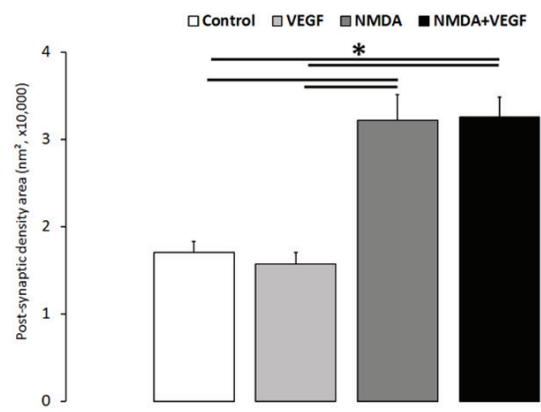
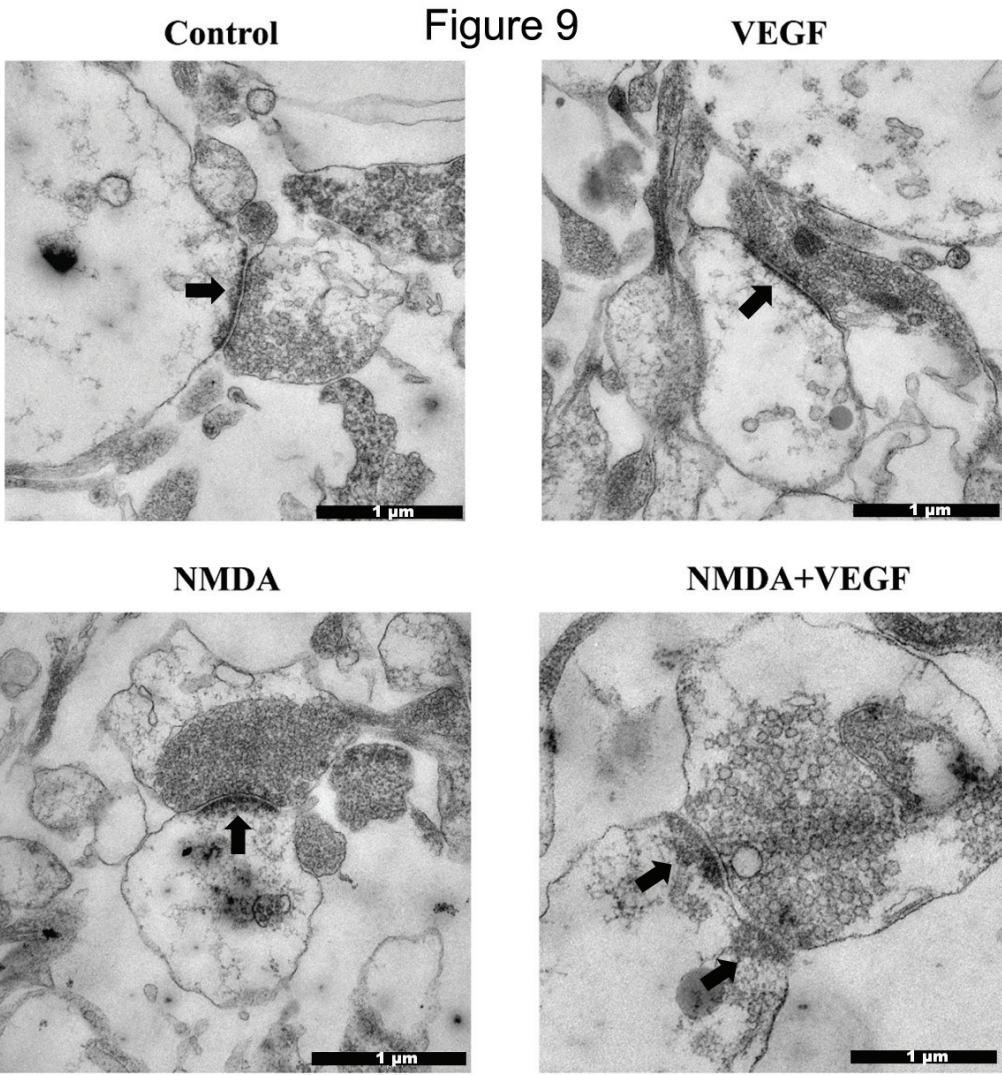




Figure S1

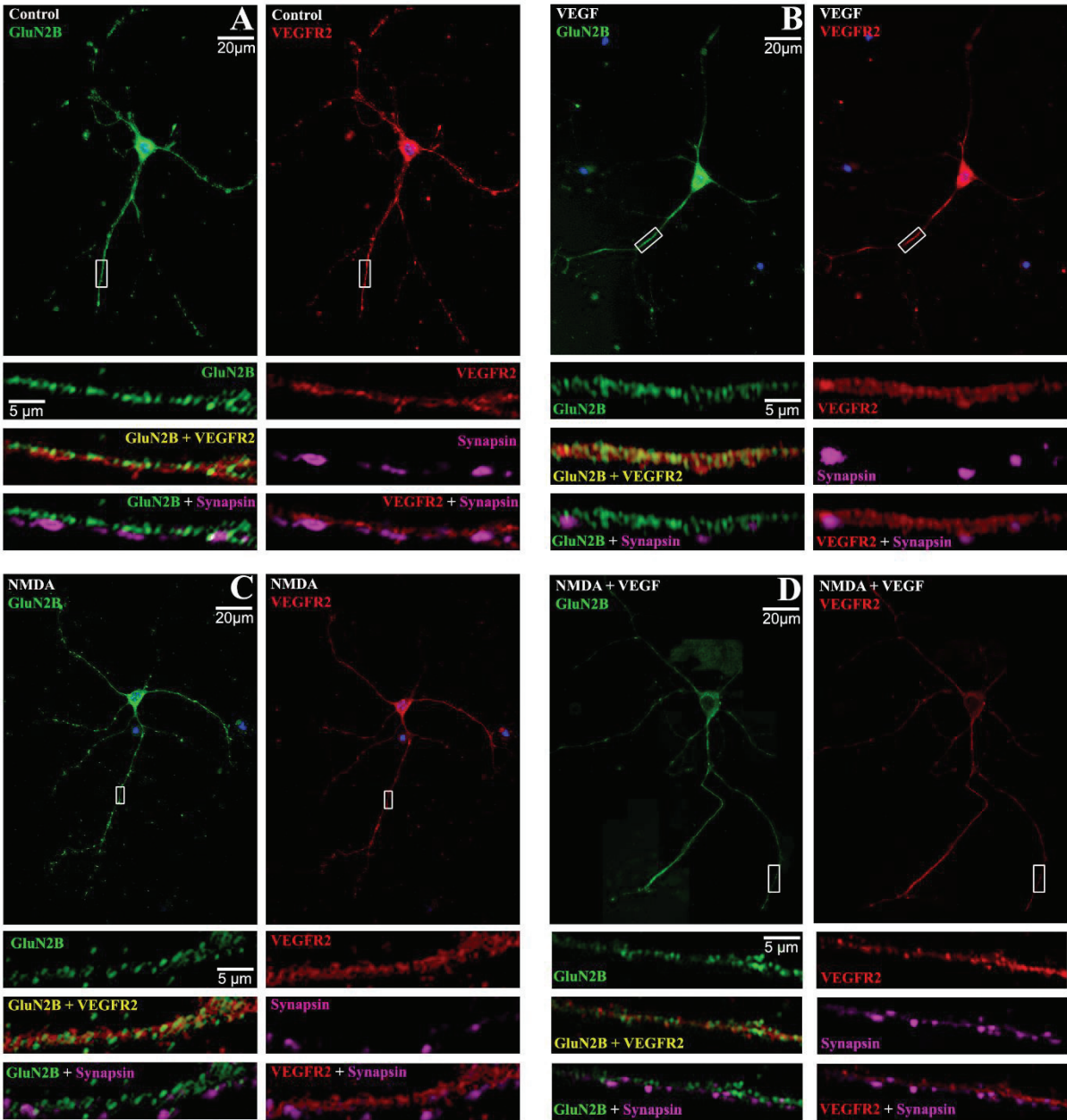
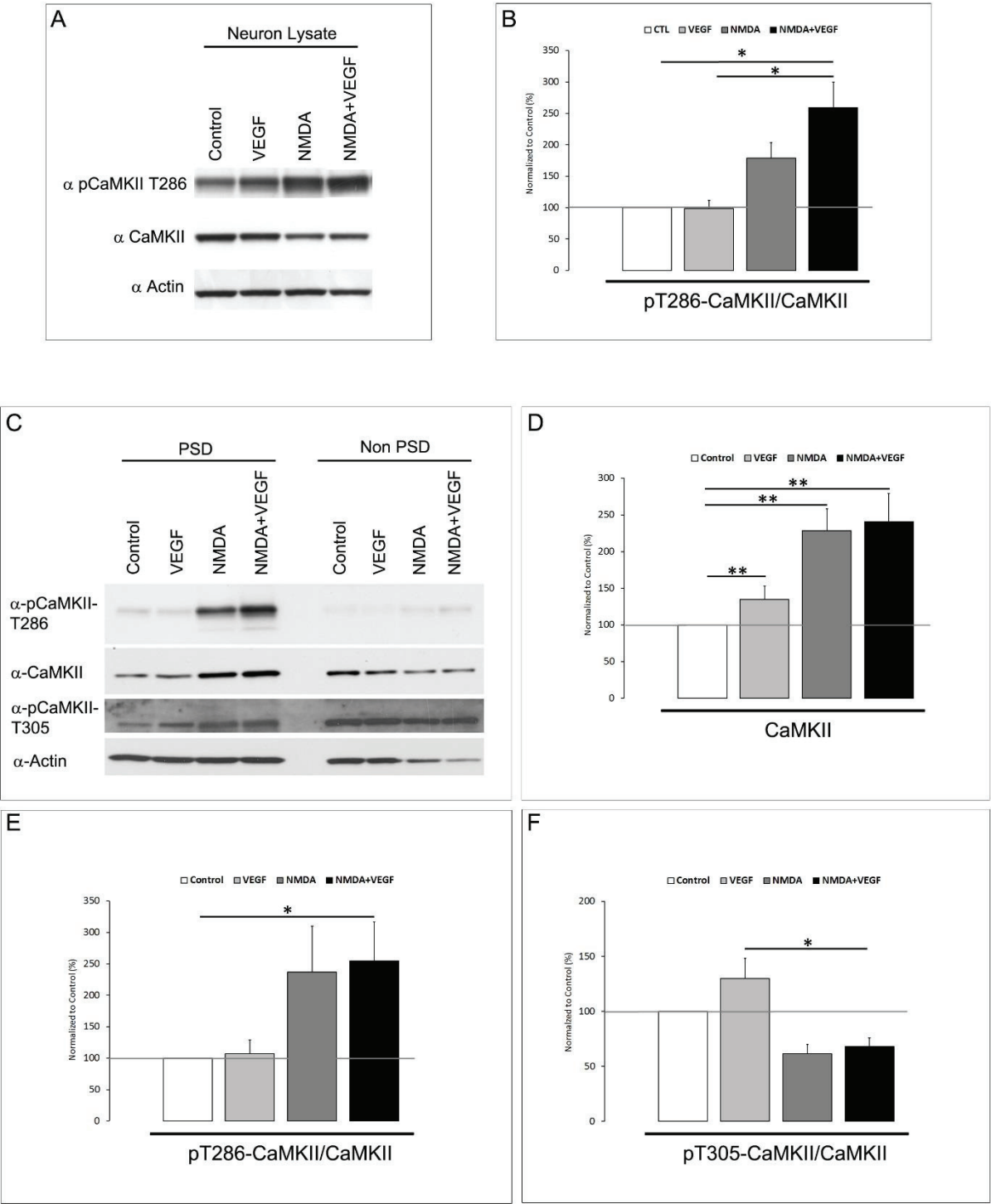


Figure S2







## **Partie II :** Implication du VEGF dans le comportement de la souris et de la drosophile



## INTRODUCTION



L'étude de la mémoire se fait principalement chez le rongeur (souris ou rats notamment) par le biais de tests mettant en jeu leur mémoire spatiale. Plusieurs tests comportementaux permettent d'évaluer la mise en mémoire d'informations spatiales chez les rongeurs. La piscine de Morris (Morris Water Maze, MWM) est un test qui consiste à rechercher la localisation d'une plateforme immergée dans une piscine. Avant le test, la souris est entraînée à apprendre la localisation de cette plateforme qui est alors visible, et ce grâce à certains indices visuels localisés dans la pièce d'expérimentation (objets, photos, forme, fenêtres). Le labyrinthe radial est un autre test qui permet de discriminer la mémoire spatiale de la mémoire non spatiale (souvent associé à des motivations alimentaires) des rongeurs. Ce labyrinthe peut être composé de 4 à 12 bras disposés en rayons autour d'une arène centrale. Le test consiste à mettre de la nourriture sur tous les bras ou sur seulement certains bras afin d'évaluer les stratégies d'exploration des rongeurs. Lorsque tous les bras du labyrinthe comportent de la nourriture, le but est de tester la mémoire de travail qui permet au rongeur de ne pas retourner sur un bras déjà exploré. Ceci correspond à une mémoire à court terme. Une autre possibilité est de fermer l'accès à certains bras du labyrinthe. Une fois les bras ouverts explorés, on retire le rongeur du labyrinthe puis on l'y replace après un période de temps relativement longue. Le but cette fois est de tester la mémoire à long terme du rongeur en lui faisant développer une stratégie d'exploration plus complexe. Ces deux tests (piscine de Morris et Labyrinthe radial) sont des tests hippocampes dépendants, c'est-à-dire qu'ils ne font pas (ou de façon négligeable) intervenir d'autre structure que l'hippocampe. Ces tests permettent d'explorer le rôle de divers acteurs : soit on évalue les conséquences d'une mutation génétique effectuée pour une protéine clef impliquée dans la LTP en comparant les performances d'apprentissage des souris mutantes avec un groupe contrôle, le but étant de déterminer le rôle exact de cette protéine dans les processus mnésiques ; soit on étudie l'impact d'une pathologie sur l'apprentissage (ie la dépression, la schizophrénie, Alzheimer) ; soit on teste une substance pharmacologique afin de voir son effet sur l'apprentissage ou la rétention de l'information, notamment dans des conditions pathologiques.

Le cued fear conditioning fait quand à lui intervenir plusieurs structures, principalement l'hippocampe et l'amygdale. Le principe du test est simple : les rongeurs sont placés dans une cage test avec des indices visuels et olfactifs forts. Durant une courte période, le rongeur est libre d'explorer la cage d'expérimentation. Au bout d'un certain temps un stimulus visuel ou

auditif est émis (c'est ce que l'on appelle le « Cued ») et est associé à un choc électrique au niveau des pattes de l'animal. Ce stimulus aversif va provoquer un comportement de freezing (absence de mouvement sauf mouvements respiratoires). 24h après ce conditionnement, les rongeurs sont placés dans la même cage avec un contexte environnemental identique, et on enregistre leur comportement et leurs mouvements afin de déterminer s'il y a eu association entre le choc électrique et le contexte environnemental et spatial. Cette association dépend du traitement de l'information dans l'hippocampe. 25h après, les rongeurs sont placés à nouveau dans la cage expérimentale mais le contexte visuel et olfactif a été changé afin qu'il ne puisse plus être associé au choc électrique. Dans ce nouveau contexte on enregistre le comportement des rongeurs, puis après quelques instants, le stimulus « cued » est émis. L'association de ce stimulus avec le choc électrique est de type Pavlovien et met en jeu principalement l'amygdale. Le principal avantage du test de fear conditioning est sa rapidité car les animaux apprennent en un seul essai (Curzon, Rustay et al. 2009).

Le rôle du VEGF dans l'apprentissage est maintenant bien connu mais les mécanismes d'action mis en jeu le sont moins. Les premières études sur le sujet suggèrent que l'effet du VEGF sur les processus d'apprentissage dépend de son action sur la neurogenèse dans le gyrus denté (Fabel, Tam et al. 2003; Cao, Jiao et al. 2004). Cependant, des travaux plus récents ont démontré que des souris caractérisées par une perte de fonction du VEGF induite par la surexpression génétique d'une forme soluble de VEGFR1, présentent une perturbation de la mémoire sans lien avec la densité vasculaire ou la neurogenèse (Licht, Goshen et al. 2011). L'effet direct du VEGF sur les neurones dans ce contexte n'est pas encore totalement admis par la communauté scientifique ni démontré de façon indiscutable dans les différentes études. Pour cette raison, nous avons choisi d'évaluer la possibilité d'une action directe du VEGF sur les neurones hippocampiques en utilisant un modèle de souris transgénique conditionnel qui est caractérisé par l'absence de VEGFR2 uniquement dans les neurones et les cellules gliales. D'autre part, l'utilisation de modèles animaux primitifs ne présentant pas de système vasculaire développé est également une solution intéressante pour évaluer le rôle précis du VEGF sur les neurones dans un contexte d'apprentissage ou de plasticité.

La Drosophile (*Drosophila Melanogaster*) est un modèle couramment utilisé en génétique du fait de la connaissance parfaite de son génome (séquencé en 1998). De plus, sa facilité d'élevage en fait un modèle parfait pour l'étude de la fonction des gènes et des protéines.

Malgré l'absence de système vasculaire, cet insecte exprime un facteur analogue au VEGF appelé PVF (Platelet Vascular Factor 1). Il existe trois isoformes de PVF (PVF1-3) qui se lient sur un seul récepteur, PVR (PDGF and VEGF Receptor Related). Cette voie PVF/PVR est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine (Duchek, Somogyi et al. 2001; Kiger, Baum et al. 2003), dans la migration cellulaire (Duchek, Somogyi et al. 2001; Jekely, Sung et al. 2005) ainsi que dans le développement de la corde ventrale (Sears, Kennedy et al. 2003; Olofsson and Page 2005). PVR est exprimé par les neurones chez la drosophile et permet le guidage des axones pendant le développement (Learte, Forero et al. 2008). L'existence d'un facteur analogue au VEGF en l'absence de système vasculaire fait de la Drosophile un modèle idéal pour étudier le rôle direct du VEGF sur les neurones. Cependant, il n'a pas encore été établi de lien entre la voie PVF/PVR et les processus de plasticité. Les Drosophiles expriment également des récepteurs NMDA qui comme PVR sont simplifiés puisque la drosophile n'exprime qu'une isoforme de NR1 et une isoforme de NR2. Les récepteurs NMDA sont impliqués dans la mémoire olfactive (Xia, Miyashita et al. 2005; Tamura, Horiuchi et al. 2010), la mémoire à moyen terme (Wu, Xia et al. 2007) et à long terme (Xia, Miyashita et al. 2005; Wu, Xia et al. 2007; Chen, Wu et al. 2012; Miyashita, Oda et al. 2012) ainsi que dans les processus associatifs (Qin and Dubnau 2010). Ils sont également impliqués dans des phénomènes de plasticité liés au comportement de phototaxie (Zhou, Lei et al. 2010) qui correspond à l'attraction naturelle des mouches pour la lumière.

L'expression de la voie PVF/PVR et des récepteurs NMDA dans les neurones chez la drosophile suggère une possible interaction entre ces deux voies comme nous l'avons montré chez le rongeur (présente étude, (Meissirel, Ruiz de Almodovar et al. 2011)). Le modèle de la drosophile devient alors non seulement une alternative intéressante pour décortiquer le rôle de cette interaction dans les neurones, mais suggère que l'interaction VEGF/NMDA est conservée au cours de l'évolution.





## RESULTATS

## Protocoles

**Conditionnement à la peur :** Des souris mâle de fond génétique C57Bl6 utilisés pour ce test ont été obtenu par collaboration avec le Buchmann Institute (Goethe University Frankfurt). 5 souris Cre(-) VEGFR2(lox/lox), 8 souris Cre(-) VEGFR(lox/-) et 5 souris Cre(+) VEGFR2(lox/-) ont été utilisé pour ce test. **Conditionnement :** le test de conditionnement durait 3 min. Un stimulus aversif (choc électrique, 0.7V pendant 2 sec (barre rouge)) été associé avec contexte (environnement de la cage d'expérimentation) et à un stimulus neutre (Son à 2800Hz pendant 30 sec, commençait 28 sec avant le choc électrique (barre mauve)). La réponse à la peur est exprimée par le pourcentage d'immobilité (Freezing) en fonction du temps. **Test au contexte :** afin de tester la capacité de rétention d'information par l'hippocampe chez les 3 génotypes, nous avons placé des souris dans le même contexte expérimental que lors du conditionnement 24h après ce dernier. Il n'y avait aucun stimulus ni auditif ni électrique. **Test au nouveau contexte :** une heure après le test au contexte, les souris sont placées à nouveau dans la même cage expérimentale, mais dans un nouveau contexte (changement de décoration, d'odeur et de fond de cage). Les souris exploraient librement pendant 1 minute avant le début du stimulus auditif. Le temps de freezing et les petits mouvements étaient enregistrés par une caméra fixée sur la cage et reliée à un setup d'analyse. Ce genre de test requiert au minimum 12 souris par groupe pour être interprété, raison pour laquelle, aucune analyse statistique n'a été réalisée. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne sans barre d'erreur.

**Enregistrements électrophysiologiques en Patch Clamp :** Pour préparer les tranches, les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (150mg/kg) puis décapitées. Le cerveau est prélevé puis immédiatement placé dans une solution d'aCSF refroidie à 4°C : 124mM NaCl, 26mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.5mM KCl, 1.25mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 1.3mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM glucose (300 mOsm). Des tranches coronales d'une épaisseur de 350 µm sont réalisées à l'aide d'un vibratome (Leica VT1000S). Les cellules pyramidales de CA1 sont enregistrées par la technique de patch-clamp visualisée avec des électrodes de résistance de 5MΩ, en configuration de potentiel imposé. La solution intracellulaire d'enregistrement est la suivante: 120 mM Cesium-gluconate, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM phosphocreatine, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM Na ATP, 0.4 mM GTP and 10 mM HEPES (300 mOsm at pH 7.2). Les tranches d'hippocampe baignent dans une solution de perfusion qui contient : 124 mM NaCl,

26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.3 mM MgCl<sub>2</sub> and 10 mM glucose. Pour évoquer une réponse synaptique, une stimulation d'intensité constante est appliquée toutes les 5 sec. La réponse synaptique NMDA et AMPA est enregistrée au potentiel de repos du neurone -70mV et à +40mV en présence de picrotoxine (100µM), un antagoniste des récepteurs GABAergiques de type A. Les régions CA3 et CA1 des tranches sont séparées au préalable pour éviter la propagation d'une activité de type épileptiforme. Au potentiel +40mV, le blocage Mg<sup>2+</sup> du récepteur NMDA est levé et l'amplitude de la réponse NMDA est mesurée directement après application d'un antagoniste des récepteurs AMPA, le NBQX (5-10 µM). La réponse AMPA est obtenue par soustraction de la réponse NMDA à la réponse basale enregistrée à +40mV en absence de NBQX.

**Comportement phototaxique de la Drosophile :** Différentes souches de mouche ont été utilisées pour cette étude: la souche ElavGS-NR2-RNAi (Zhou et al, 2010), les souches inductibles ElavGS-PvrDNII et ElavGS-PvrDNIII, dont l'induction de la mutation se fait par apport de RU486 dans la nourriture (obtenues de l'équipe de Pernille Rorth, Université de Copenhague) et les souches de mouches contrôles Cs et ElavGS. Les mouches ont été élevées à 18°C dans le but de limiter les fuites d'expression génique. Chaque souche est répartie en deux catégories, les mouches ayant un cycle nyctéméral normal avec une alternance jour/nuit de 12 heures, appelées L:D, et les mouches privées de lumière au cours de leurs cinq à six premiers jours de vie, appelées D:D (ElavGS-NR2-RNAi L:D N=15, D:D N=15 ; ElavGS-PvrDNII L:D N=7, D:D N=6 ; ElavGS-PvrDNII +RU486 L:D N=13, D:D N=13 ; ElavGS-PvrDNIII L:D N=15, D:D N=17 ; ElavGS-PvrDNIII +RU486 L:D N=14, D:D N=15). Le test de phototaxie est adapté des études de Seugnet et al, 2009 et Zhou et al, 2010 (Seugnet, Suzuki et al. 2009; Zhou, Lei et al. 2010). Les mouches sont placées dans un labyrinthe composé d'un couloir central (2 mm de largeur et 1,4 mm de hauteur) menant à deux sorties : une éclairée et une obscure. La surface du labyrinthe est en plexiglass recouvert d'un filtre rouge, fréquence à laquelle les mouches sont aveugles, ce qui permet d'observer leur comportement sans perturber le test. Après introduction dans le labyrinthe, la prise de décision d'aller d'un côté ou de l'autre doit être réalisée en moins de 30 secondes et chaque mouche exécute ce test quatre fois. Les scores sont calculés par l'entrée des mouches dans la branche lumineuse du labyrinthe : 0 visite = 0%, 1 visite = 25%, 2 visites = 50%, 3 visites = 75% et 4 visites = 100%. Les résultats sont représentés par la moyenne des scores +/- SEM et la comparaison statistique

entre les groupes L:D et D:D de chaque souche s'est faite par le test t de Student. Les différences significative entre les groupes sont indiqués par (\*) pour  $p < 0.05$ ; (\*\*) pour  $p < 0.01$ ; (\*\*\*) pour  $p < 0.001$ .

## Implication du VEGF endogène dans la consolidation mnésique d'apprentissages associatifs chez la souris

Nous avons vu précédemment dans notre revue de la littérature que le VEGF est impliqué dans des processus de plasticité et d'apprentissage qui dépendent de l'hippocampe. Par ailleurs, notre étude a montré que le VEGF augmente la transmission synaptique générée par les récepteurs NMDA dans l'hippocampe et déclenche des mécanismes moléculaires liés à la plasticité synaptique. Cependant, il reste à démontrer que l'impact du VEGF sur les performances mnésiques résulte d'un effet direct sur l'activité des réseaux neuronaux hippocampiques. Dans ce but, nous avons choisi d'évaluer les performances mnésiques à des tests d'apprentissage associatif de souris transgéniques caractérisées par une invalidation conditionnelle du récepteur VEGFR2 dans les cellules nerveuses. Ces souris se répartissent en trois groupes de génotype distincts, les souris déficientes en VEGFR2 ( $VEGFR2^{lox/-} Cre^+$ ), les souris hétérozygotes négatives pour Cre ( $VEGFR2^{lox/-} Cre^-$ ) et les souris contrôles, également négatives pour Cre ( $VEGFR2^{lox/lox} Cre^-$ ). Le test comportemental que nous avons sélectionné s'appuie sur un apprentissage de peur conditionnée au contexte qui s'articule en trois phases. Une première phase de conditionnement à la peur où la souris apprend à associer un stimulus auditif (son) à un stimulus aversif (choc électrique) dans un contexte particulier. Une deuxième phase de test où seule l'influence du contexte environnemental sur le comportement de la souris est estimée. Ceci permet d'évaluer la consolidation mnésique de l'apprentissage associatif lié au contexte qui dépend principalement de l'hippocampe. Enfin, les souris sont soumises à un dernier test où leur capacité d'associer le stimulus auditif au stimulus aversif est estimée dans un nouveau contexte. Il s'agit de déterminer si la consolidation de l'apprentissage associatif peut s'effectuer indépendamment du contexte avec cette fois l'implication de l'amygdale.

## Test de conditionnement à la peur chez des souris transgéniques conditionnelles pour VEGFR2

Nos résultats sont préliminaires à l'heure actuelle car seules 5 souris contrôles, 4 souris déficientes pour VEGFR2 et 8 souris hétérozygotes ont été testées. En effet, il est nécessaire de comparer des groupes d'au moins 15 souris par génotype dans un test de conditionnement à la peur pour obtenir des résultats pertinents. De ce fait, les résultats sont présentés sans barre d'erreur et aucun test statistique n'a été réalisé. Pour analyser de manière quantitative ce conditionnement, la réponse comportementale d'immobilisation tonique, sans aucun mouvement associé ou « freezing », est évaluée. L'apparition du freezing est évaluée toutes les 5 secondes au cours du conditionnement comme lors des tests au contexte et au nouveau contexte. L'analyse du Freezing est présentée sous la forme de courbes illustrant la cinétique du freezing en fonction du temps. L'acquisition de la vidéo durant les trois phases du test se fait par une caméra qui, toutes les 40 ms, compare la position de la souris avec l'image précédente. Ce paramètre nous permet de calculer la proportion du temps que la souris a passé soit en mouvement soit en freezing. Les courbes illustrent ici le pourcentage de freezing calculé par tranche de 5 secondes.

### Conditionnement à la peur ou conditioning

Le conditionnement permet aux souris d'associer un son et un contexte spécifique à un choc électrique (Figure 1A). Ici nous avons choisi un stimulus auditif de 2800Hz associé à un choc électrique de faible intensité pendant 2 secondes. L'émission du stimulus auditif (indiqué sur le graphique par une barre mauve) est décalée par rapport au stimulus aversif (indiqué par la barre rouge). Lors du conditionnement, chaque groupe de souris a eu le même comportement. Pendant la période de deux minutes précédant l'émission sonore, les souris ont un comportement exploratoire avec de nombreux petits mouvements exploratoires (50-55% des deux minutes pour les trois groupes), de grands mouvements exploratoires (30-35% des deux minutes pour les trois groupes) et quelques phases d'immobilité (15-20% des deux minutes pour les trois groupes) correspondant généralement aux phases de toilettes. Suite à l'émission du son et avant le choc électrique (période de 28 secondes), on remarque une légère diminution des petits mouvements exploratoires seulement chez les souris contrôles et hétérozygotes (40-45% des 28 secondes) mais pas chez les souris déficientes en VEGFR2 (55% des 28 secondes). Après le choc électrique, les 3 groupes de souris ne présentent plus

de grand mouvement exploratoire et restent en freezing (45 à 65% de la dernière minute) ou réalisent de petits mouvements exploratoires (30 à 45% de la dernière minute). L'analyse vidéo suggère que ces petits mouvements exploratoires permettent aux souris de se prosterner dans un des quatre coins de la cage d'expérimentation.

#### Test au contexte

24h après le conditionnement, les souris sont soumises à un second test. Il s'agit d'évaluer leur capacité à associer un contexte particulier à un stimulus aversif. Les souris sont donc replacées dans la même cage que le jour précédent mais cette fois aucun stimulus n'est appliqué (Figure 1B). Les souris hétérozygotes et contrôles présentent des comportements similaires avec de longues périodes de freezing (50% du temps) et de petits mouvements exploratoires (35-40% du temps). Ces deux groupes de souris explorent leur environnement seulement 10% du temps par de grands mouvements. Ces résultats suggèrent que les souris contrôles et hétérozygotes ont assimilé le contexte environnemental au stimulus aversif. En revanche, le groupe des souris déficientes en VEGFR2 a des périodes d'immobilité plus réduites (35% du temps), de nombreux petits mouvements exploratoires (50%) et légèrement plus de grands mouvements (15%). Cette différence de comportement entre le groupe des souris déficientes et les deux autres groupes est plus importante pendant la première minute du test. Au cours des deux minutes suivantes, le pourcentage de freezing diminue progressivement chez les souris contrôles et hétérozygotes pour rejoindre les valeurs obtenues chez les souris déficientes. Ces données suggèrent que l'absence de VEGFR2 dans les cellules neurales, et en particulier dans les neurones, perturbe la consolidation d'un apprentissage associatif contextuel qui dépend de l'hippocampe.

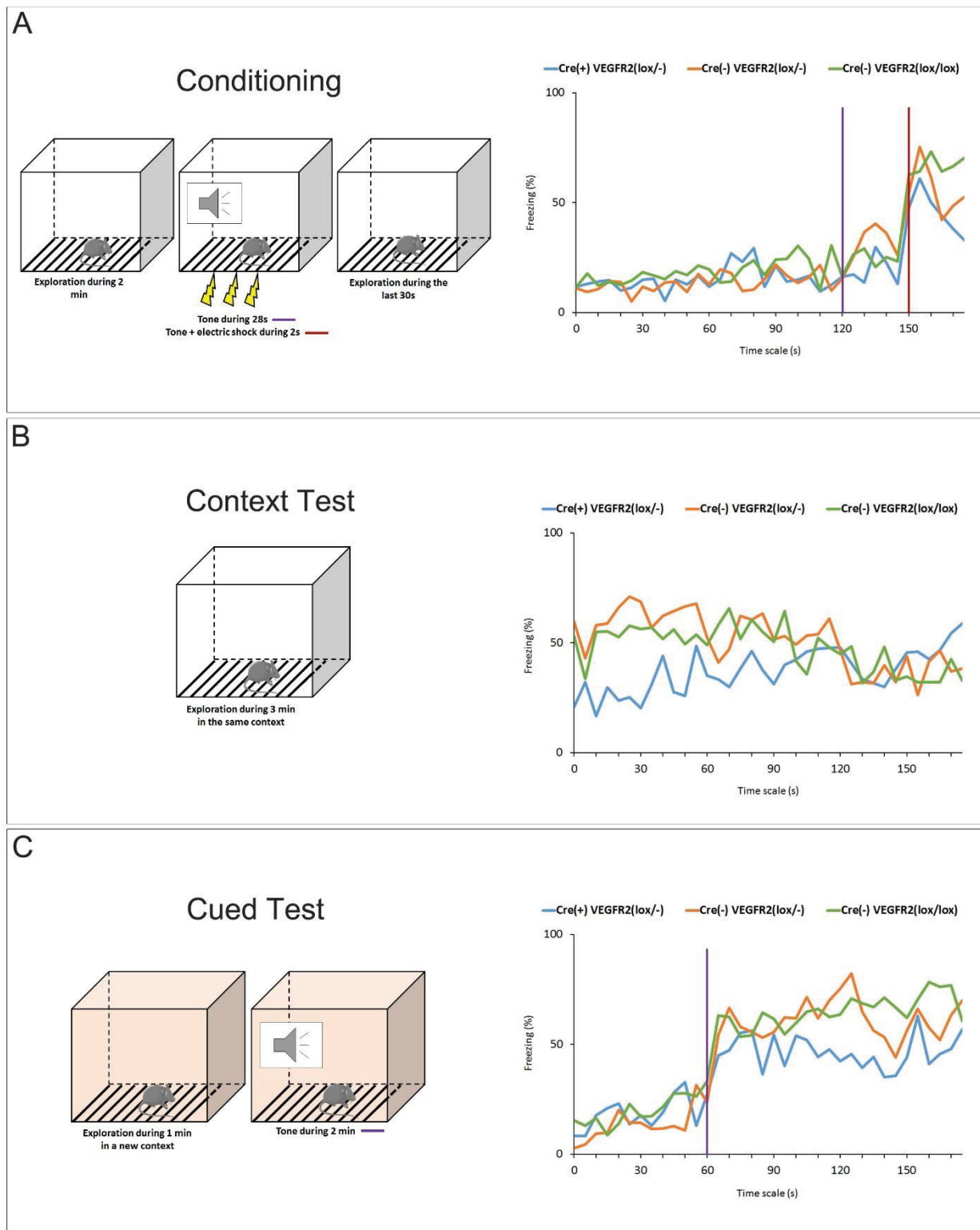
#### Test au nouveau contexte

Enfin, 1 heure après le test au contexte, les souris sont soumises à un nouveau test afin de vérifier leur capacité d'association entre le stimulus auditif et aversif indépendamment du contexte. Dans ce but, la cage expérimentale de test est modifiée sous plusieurs aspects : l'aspect visuel, avec une décoration différente de la cage, et l'aspect olfactif, avec l'introduction d'une nouvelle odeur dans la cage. Cette double modification empêche les souris de reconnaître la cage d'expérimentation et forme un nouveau contexte propice à

l'exploration (Figure 1C). Pendant la première minute, le comportement des souris dans ce nouvel environnement est évalué. Les trois groupes présentent des comportements similaires avec des périodes d'immobilité très réduites (15%), de nombreux mouvements exploratoires dont 50% de petits mouvements. Ces résultats permettent de valider le changement de contexte car le comportement des trois groupes de souris est un comportement de type exploratoire en tout point comparable à la première phase du conditionnement. Ensuite, les souris sont exposées au stimulus sonore continu pendant les deux dernières minutes du test (indiqué par la barre mauve sur le graphique). Les souris contrôles et hétérozygotes s'immobilisent en freezing la majorité du temps (60% des deux minutes) et n'exécutent que quelques petits mouvements exploratoires (30%). Ces résultats suggèrent que l'association son/choc s'est correctement réalisée. En revanche, le comportement des souris déficientes se répartit différemment avec 45% du temps passé en freezing et 45% du temps passé en petits mouvements exploratoires. On peut noter que le temps de freezing des souris déficientes est plus faible que celui des deux autres groupes principalement au cours des premières 90 secondes suivant l'émission sonore. Ainsi, la déficience des cellules neurales en VEGFR2 perturberait également la consolidation d'apprentissages associatifs impliquant l'amygdale.

En conclusion, ces premiers résultats semblent indiquer que l'absence de VEGFR2 dans les cellules neurales chez la souris perturbe la consolidation des apprentissages associatifs qui mettent en jeu l'hippocampe et l'amygdale. Nous rappelons que ces données sont préliminaires et d'autres souris seront testées prochainement pour affiner ces résultats.



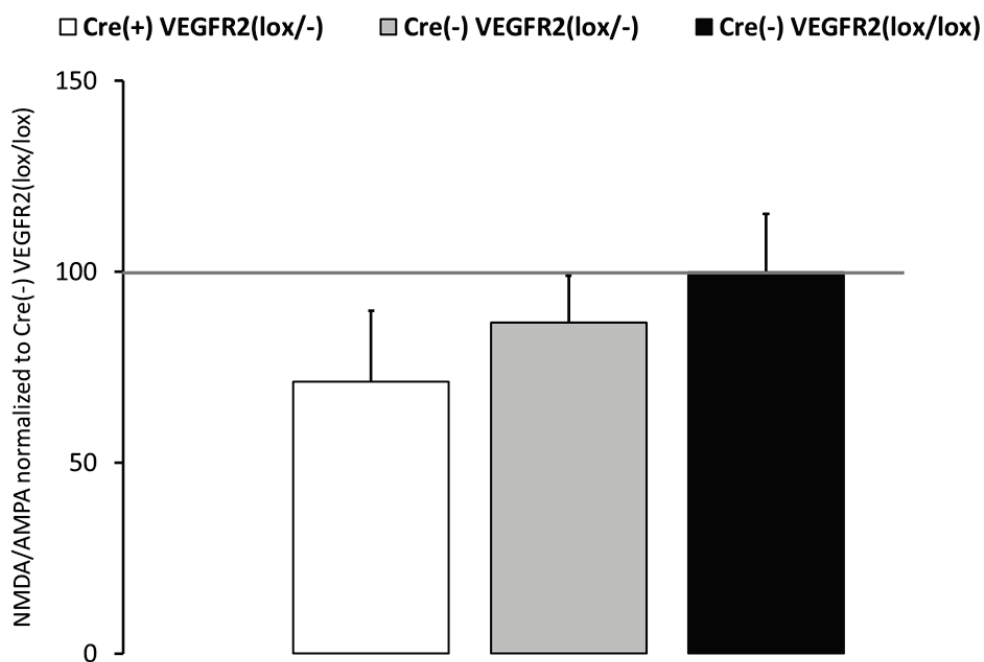


**Figure 1: Fear conditioning:** The experimental set up is illustrated on the left and the time course of Freezing during the experiment on the right. 5 Cre(-) mice, 4 Cre(+) mice and 8 Cre(+/-) mice were tested. **A** : conditioning session. Purple line labelise the neutral stimulus and the red line the aversive stimulus. The conditioning session lasts 3 minutes. **B** : Context test. Mice were placed in the same experimental cage as conditioning for 3 minutes. **C** : Cued test. Mice were placed in a different context from conditioning but the neutral stimulus was applied. This session lasts 3 minutes. Graph do not have error bar and no statistical analysis were performed due to the small number of mice tested in each group.

## Perturbation de la transmission synaptique chez les souris adultes déficientes en VEGFR2

Après avoir passé le test de conditionnement à la peur, les souris sont restées deux semaines dans leur cage. Nous avons ensuite évalué l'effet de la délétion du VEGFR2 sur la transmission synaptique dans CA1 par des enregistrements électrophysiologiques en patch clamp sur tranche aiguë d'hippocampe. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la composition des récepteurs glutamatergiques synaptiques. Le but est de déterminer si la proportion des récepteurs AMPA et NMDA localisés aux synapses change avec une déficience en VEGFR2. Nos données actuelles sont préliminaires car seulement 3 souris contrôles (Cre(-) VEGFR2 (lox/lox)), 4 souris hétérozygotes (Cre(-) VEGFR2 (lox/-)) et 6 souris déficientes en VEGFR2 (Cre(+) VEGFR2 (lox/-)) ont été testées. Néanmoins, nous allons décrire les tendances qui ressortent de cette première série d'expérience.

**Figure 2 : Effects of VEGFR2 deletion on glutamatergic synaptic transmission :** Whole cell patch clamp was performed to assess the NMDA/AMPA ratio at synaptic site. 4 Cre(+) VEGFR2 (lox/-), 8 Cre(-) VEGFR2(lox/-) and 5 Cre(-) VEGFR2(lox/lox) were test. Value were normalized by the control group (Cre(-) VEGFR2(lox/lox)).



On remarque que le ratio NMDA/AMPA diminue chez les souris Cre(+) VEGFR2 (lox/-) par rapport au souris Cre(-) VEGFR2 (lox/lox) [Cre(+) VEGFR2 (lox/-) NMDA/AMPA=71.2%]. Il en est de même pour les souris Cre(-) VEGFR2 (lox/-) [Cre(-) VEGFR2 (lox/-) NMDA/AMPA=86.7%]. A partir de ces résultats, Deux scénarios peuvent expliquer ces différences. Soit les neurones hippocampiques des souris déficientes expriment moins de récepteurs NMDA à la synapse par rapport aux souris contrôles, soit la proportion de leurs récepteurs AMPA synaptiques est augmentée. Nous ne pouvons pas conclure sur la base de nos données actuelles mais deux approches complémentaires nous permettront de répondre à cette question. Tout d'abord, nous pourrions analyser la proportion de récepteurs AMPA synaptiques par l'enregistrement des potentiels de champs locaux. Nous pourrions également faire l'analyse de la transmission synaptique spontanée, qui dépend principalement des récepteurs AMPA. Ces deux approches nous permettront d'identifier le mécanisme responsable de la diminution du ratio NMDA/AMPA dans l'hippocampe des souris déficient en VEGFR2.

Enfin, l'analyse de la proportion des récepteurs NMDAR2B synaptiques est en cours pour ces trois groupes de souris, et les données ne peuvent donc être discutées ici.

## Rôle des voies PVF/PVR et glutamate/NMDAR dans des phénomènes de plasticité chez la drosophile

L'organisation simplifiée de son système nerveux et l'existence de nombreux outils génétiques font de la drosophile un modèle de choix pour étudier l'implication d'une interaction entre les voies du VEGF et du glutamate dans les processus de plasticité. De plus, l'absence d'un système vasculaire spécialisé chez cet insecte permet d'étudier l'impact de la signalisation VEGF/VEGFR2 sur les processus de plasticité indépendamment de son effet indirect sur les vaisseaux sanguins. Les drosophiles présentent un comportement inné d'attraction vers la lumière ou comportement de phototaxie. Cependant, l'élevage de drosophiles à l'obscurité pendant une période de 6 jours après l'éclosion des larves permet de réduire cette préférence pour la lumière chez des mouches adultes. Il s'agit d'un phénomène de plasticité lié à l'expérience visuelle qui met en jeu les récepteurs NMDA (Zhou, Lei et al. 2010). Afin d'évaluer si les mécanismes moléculaires qui sont à la base de ces phénomènes de plasticité impliquent à la fois les récepteurs au NMDA et au VEGF, nous avons sélectionné plusieurs souches de

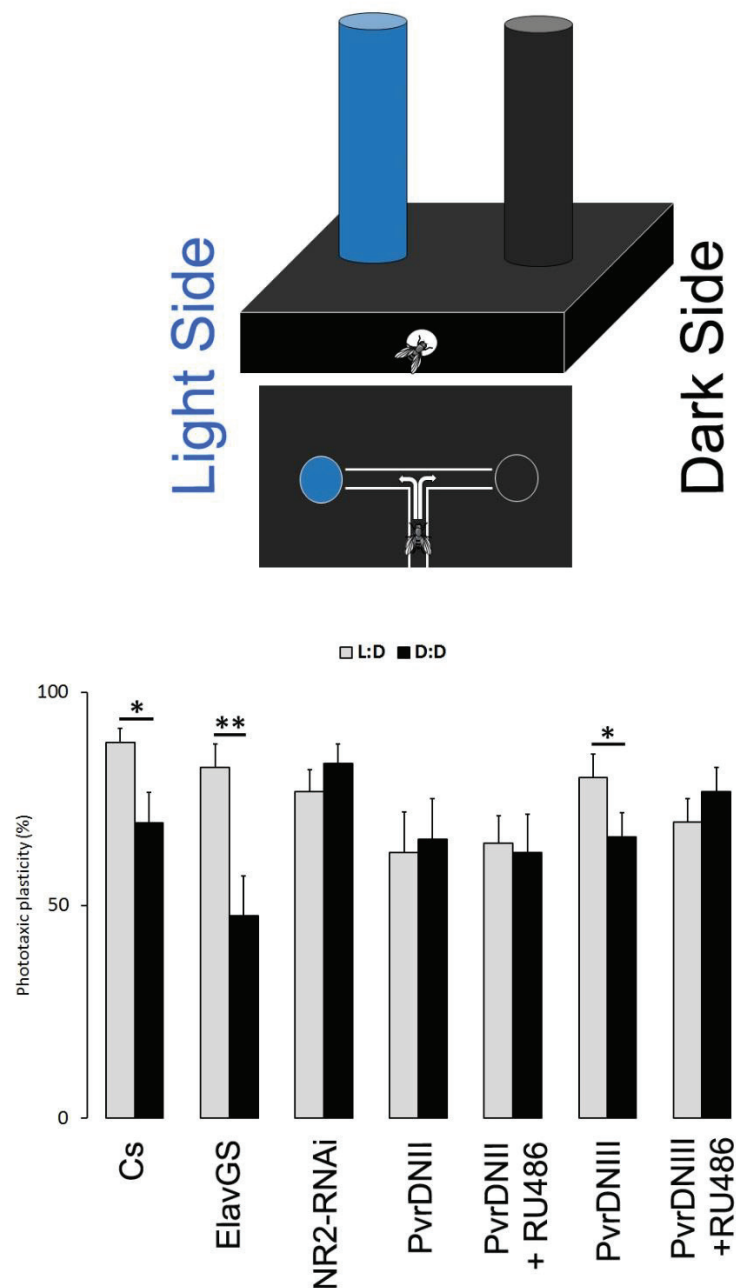
drosophiles mutantes pour l'un ou l'autre de ces récepteurs. Les différentes souches de mouches sont soumises à un test de phototaxie à l'aide d'un labyrinthe à deux branches. Chaque souche est répartie en deux catégories, les mouches ayant un cycle nycthéral normal avec une alternance jour/nuit de 12 heures appelées L:D, et les mouches privées de lumière au cours de leurs premiers cinq à six jours de vie, appelées D:D. Les mouches sont placées dans l'entrée du labyrinthe avec deux chemins possibles. Le premier chemin est éclairé par une lumière bleue (Light side) et le second est plongé dans l'obscurité (dark side). Pour être validée, la prise de décision d'aller d'un côté ou de l'autre doit être réalisée en moins de 30 secondes et chaque mouche exécute ce test phototaxique quatre fois. Un résultat proche de 50% indique que la mouche choisit son chemin au hasard, indépendamment des indices lumineux, alors qu'un score proche de 100% révèle que la mouche est spécifiquement attirée par la lumière. Un comportement phototaxique normal se traduit par une différence significative entre les résultats des mouches L:D et D:D d'une même souche car les mouches D:D sont insensibles à la phototaxie. L'absence de différence entre les performances de ces deux groupes révèle une altération du comportement phototaxique pour chacun des groupes.

Nos résultats montrent que les mouches contrôles CS ou ElavGS L:D se dirigent significativement plus du côté éclairé ( $Cs = 88.33\% \pm 3.33\%$  ;  $ElavGS = 82.50\% \pm 5.34\%$ ). En revanche, les mouches D:D de mêmes souches, sont insensibles à la phototaxie ( $Cs = 69.44\% \pm 7.16\%$ ,  $p=0.02$   $N=15-18$  ;  $ElavGS = 47.50\% \pm 9.46\%$ ,  $p=0.0024$   $N=10-10$ ). Une étude récente a révélé que le comportement de phototaxie met en jeu des phénomènes de plasticité dépendant des récepteurs NMDA (Zhou, Lei et al. 2010). Pour confirmer l'impact de ces récepteurs au glutamate, nous avons utilisé une souche déficiente pour la sous-unité NR2 des récepteurs NMDA (ElavGS-NR2-RNAi). Nos résultats ne montrent aucune différence entre les mouches L:D et D:D de cette souche ( $L:D = 76.67\% \pm 5.16\%$  ;  $D:D = 83.33\% \pm 4.67\%$  ;  $p=0.17$   $N=15-15$ ), ce qui confirme l'implication des récepteurs NMDA dans la phototaxie. Afin de tester le rôle de la voie VEGF/Pvr nous avons sélectionné deux souches distinctes de mouches transgéniques inductibles ElavGS-PvrDNII et ElavGS-PvrDNIII qui présentent une délétion de la séquence codant pour Pvr lorsque le RU486 est ajouté à leur nourriture. L'absence de différence significative entre les mouches L:D et D:D de la souche ElavGS-PvrDNII en l'absence de RU486 suggère l'existence d'une activité résiduelle (ou fuite d'activité) provoquant la délétion du gène sans stimulus inductif, avec des répercussions négatives sur le

comportement de phototaxie. Pour limiter ces possibilités de fuites d'activité observées par d'autres équipes (Dr Pernille RORTH, Université de Copenhague), nous avons utilisé la deuxième souche, ElavGS-PvrDNIII. Nos résultats montrent une différence significative entre les mouches L:D et D:D de cette souche en l'absence de RU486 (L:D = 80% +/-5.56% ; D:D = 66.17% +/-5.65% ;  $p=0.04$  N=15-17). L'apport de RU486 dans la nourriture permet d'altérer le comportement de phototaxie (L:D = 69.64% +/-5.35% ; D:D = 76.67% +/-5.70% ;  $p=0.17$  N=14-15).

L'ensemble de ces résultats indique que, les récepteurs Pvr au VEGF, comme les récepteurs au glutamate de type NMDA, sont indispensables aux processus de plasticité liés à l'expérience visuelle chez la drosophile, en éliminant toute ambiguïté sur la contribution du système vasculaire.

**Figure 3: Phototactic behavior is dependent on NMDAR and PVR activity.** Phototaxis behavior which critically relies on NMDAR dependent plasticity was assessed in flies raised in a light/dark cycle or in the dark. PVR (the VEGF receptor in drosophila) signaling was genetically blocked using a dominant negative form of the receptor (**elavGS>UAS-pvrDN**) and NR2 subunit of NMDAR were silenced using a specific RNAi (**elavGal4>UAS-NR2RNAi**). Significant difference between conditions are indicating by (\*) for  $p < 0.05$ ; (\*\*) for  $p < 0.01$ ; (\*\*\*) for  $p < 0.001$ .





## DISCUSSION





Au cours de mes trois années de thèse, j'ai étudié le rôle du VEGF dans la régulation de l'activité de la synapse glutamatergique. Nos travaux ont montré pour la première fois un effet direct du VEGF sur la transmission synaptique glutamatergique dans l'hippocampe qui dépend de l'expression neuronale de VEGFR2. Cet effet du VEGF correspond à une augmentation rapide de l'amplitude des courants post-synaptiques excitateurs générés par les récepteurs NMDAR2B dans les cellules pyramidales des régions CA1 et CA3. La mise en évidence d'une interaction entre le domaine extracellulaire de VEGFR2 et les récepteurs NMDAR2B dans un système d'expression hétérologue, suggère que le VEGF peut réguler l'organisation synaptique des récepteurs NMDA. En effet, la stimulation conjointe des récepteurs au VEGF et au NMDA des neurones hippocampiques favorise la formation de nouvelles synapses et le recrutement synaptique des NMDAR2B, par l'intermédiaire du VEGFR2. Cette coïncidence d'activité des récepteurs met en jeu deux voies de signalisation principales : la voie PLC $\gamma$  et CaMKII et favorise l'expression de nouveaux récepteurs AMPA à la synapse. L'implication de la voie CaMKII associée au recrutement synaptique des récepteurs AMPA est généralement nécessaire à l'induction de processus de plasticité synaptique comme la potentialisation à long terme (LTP). L'ensemble de ces résultats nous a donc conduit à évaluer le rôle du VEGF et de son récepteur VEGFR2 dans la mise en mémoire d'apprentissage lié à la fonction hippocampique. Nos résultats préliminaires indiquent qu'une déficience en VEGFR2 spécifiquement dans les cellules neurales perturbe les capacités de mémorisation chez des souris transgéniques conditionnelles. Ce couplage entre les voies de signalisation glutamate/NMDAR et VEGF/VEGFR2 pourrait être à la base des processus de plasticité synaptique dans différents systèmes, car nos données suggèrent qu'il joue également un rôle dans la modulation du comportement de phototaxie chez la drosophile.

Dans la discussion, je vais expliciter les différents mécanismes sous-jacents qui peuvent être impliqués dans ces processus liés à l'activité synaptique, en confrontant mes résultats aux données de la littérature dans le domaine. L'objectif de cette discussion est d'arriver à établir un modèle qui nous permettra de mieux comprendre le mode d'action du VEGF dans la régulation de l'activité synaptique des neurones hippocampiques. Je terminerai cette discussion par des perspectives sur l'implication de la voie VEGF/VEGFR2 dans des pathologies caractérisées par un dysfonctionnement de l'activité neuronale.

## Rôle du VEGF dans l'augmentation de la transmission synaptique glutamatergique

Nos travaux démontrent que le VEGF augmente de façon rapide et importante l'activité post-synaptique des neurones hippocampiques. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Kim et collaborateurs qui montre une augmentation de l'influx calcique dans des neurones hippocampiques en culture en présence de VEGF, couplée à une amplification de la potentialisation à long terme (LTP) (Kim, Choi et al. 2008). En effet, l'entrée de calcium par l'intermédiaire des récepteurs NMDA joue un rôle essentiel dans certains processus de plasticité synaptique comme la LTP (Regehr and Tank 1990; Malenka and Bear 2004). Nous avons révélé les mécanismes moléculaires mis en jeu dans cette amplification de la transmission synaptique par le VEGF en révélant qu'il favorise le recrutement ou l'ancrage synaptique des NMDAR via son récepteur VEGFR2. Dès lors, plusieurs mécanismes non exclusifs peuvent être impliqués : 1) le VEGF peut favoriser le maintien des récepteurs NMDA actifs à la synapse par la phosphorylation de leur extrémité C-terminale. 2) Il peut faciliter l'exocytose de nouveaux récepteurs à la membrane, à partir du pool intracellulaire, qui vont diffuser en surface vers la synapse; 3) Le VEGF peut aussi moduler cette mobilité latérale des récepteurs NMDA, des sites extra-synaptiques jusqu'aux synapses ; 4) Enfin, il peut modifier le trafic de ces récepteurs en régulant le recyclage des vésicules contenant les récepteurs NMDA internalisés.

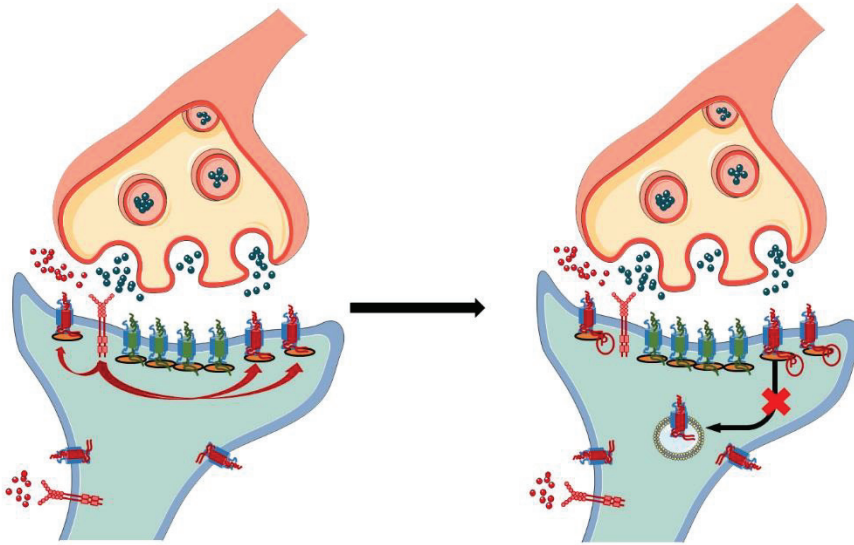
### 1) Maintien des NMDAR actifs à la synapse: (Figure ... Modèle 1)

De nombreuses études ont démontré le rôle des sites de phosphorylation localisés à l'extrémité C-terminale des récepteurs NMDA (voir introduction, VI-2-b) dans l'ancrage de ces récepteurs à la synapse. La sous-unité GluN2B possède en particulier un site de phosphorylation qui permet de réguler son expression en surface au niveau synaptique, le domaine YEKL (Roche, Standley et al. 2001; Goebel-Goody, Davies et al. 2009). En effet, la phosphorylation de la tyrosine 1472 de ce domaine permet de maintenir l'interaction de GluN2B avec la protéine d'échafaudage PSD95, et d'empêcher la fixation de la protéine AP-2, protéine adaptatrice de la Clathrine impliquée dans l'internalisation des récepteurs NMDA (Roche, Standley et al. 2001). Les précédentes études du laboratoire ont montré que l'application de VEGF sur des neurones immatures provoque la phosphorylation de leur sous-unité GluN2B sur le résidu tyrosyl 1472 du domaine YEKL, via l'activation des SFK par VEGFR2

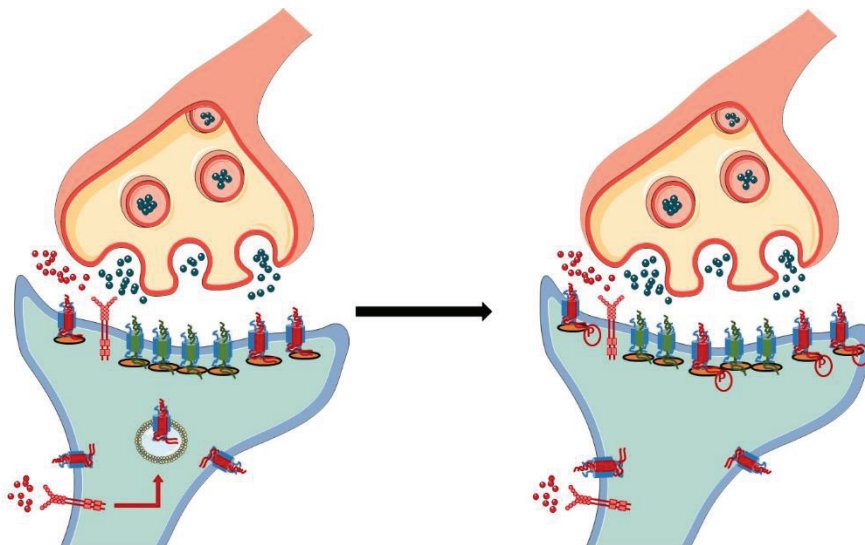
(Meissirel, Ruiz de Almodovar et al. 2011). Dans le cas des synapses glutamatergiques, le VEGF peut donc favoriser la phosphorylation des récepteurs NMDAR2B sur la tyrosine 1472, et maintenir ces récepteurs à la synapse. Ceci favoriserait l'ancrage post-synaptique d'un pool de récepteurs NMDAR2B actifs et la persistance de leur activité synaptique. Cependant ce processus ne permet pas de comprendre l'amplification de l'activité synaptique de ces récepteurs. En effet l'augmentation de la réponse synaptique suggère l'incorporation de nouveaux récepteurs NMDAR2B à la synapse.

## 2) Exocytose de nouveaux récepteurs à la membrane : (Figure Modèle 2)

L'exocytose de nouveaux récepteurs issus du pool intracellulaire est une hypothèse tout à fait plausible. En effet, le VEGF, via l'activation de son récepteur VEGFR2, permet d'augmenter la concentration du calcium intracellulaire dans les neurones hippocampiques, en partie par l'activation de la PLC $\gamma$  (Kim, Choi et al. 2008). La PLC $\gamma$  dégrade le PIP2 en IP3 et DAG. L'IP3 se fixe sur les récepteurs IP3R du réticulum endoplasmique et provoque la libération de calcium à partir des réserves intracellulaires. Or, l'augmentation des taux de calcium intracellulaire favorise le recrutement post-synaptique du complexe protéique lié à l'exocytose des vésicules chez la drosophile (Teodoro, Pekkurnaz et al. 2013). Un composant du complexe protéique d'exocytose, Sec8, participe au trafic des récepteurs NMDA et favorise leur insertion à la membrane des neurones hippocampiques (Sans, Prybylowski et al. 2003). Ainsi, on peut penser que la co-activation des récepteurs au VEGF et au NMDA favorise l'exocytose des récepteurs NMDA à la membrane via une augmentation importante des taux de calcium intracellulaire. Une étude récente indique que les récepteurs NMDA2B sont intégrés au niveau des épines par un mécanisme lié au recyclage des récepteurs internalisés qui dépend de SNAP-23, une protéine associée aux synaptosomes (Suh, Terashima et al. 2010). Cependant, nous observons une diminution de l'expression en surface des récepteurs NMDAR2B après co-activation, ce qui suggère l'existence d'un équilibre dynamique entre l'exocytose des récepteurs et leur internalisation en faveur de ce dernier processus.



**Modèle 1: Maintien des récepteurs NMDAR2B en surface par activation de VEGFR2.** Suite à l'activation de VEGFR2, le VEGF peut induire la phosphorylation de la sous unité GluN2B des récepteurs NMDA. Cette phosphorylation permet le maintien à la surface des récepteurs en bloquant l'interaction avec l'AP2 et en renforçant la l'interaction avec PSD95. La phosphorylation serait dépendante de l'activité des Src kinases.



**Modèle 2: Exocytose des récepteurs NMDAR2B après induction de la voie PLC $\gamma$  par VEGFR2.** Suite à l'activation par le VEGF, la PLC $\gamma$  vient s'activer sur les résidus tyrosines C-terminaux de VEGFR2. La PLC $\gamma$  favorise la libération de calcium des réserves intracellulaires par production d'IP3. L'augmentation des taux de calcium intracellulaire peut favoriser l'exocytose des récepteurs NMDAR2B et ainsi augmenter le pool des récepteurs NMDA synaptiques.

### 1) Diffusion latérale des récepteurs jusqu'à la synapse : (Figure Modèle 3)

Cet équilibre entre l'internalisation des récepteurs et leur exocytose s'accompagne également d'une redistribution des récepteurs déjà présents à la surface. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les récepteurs NMDA ont la particularité d'être extrêmement mobiles dans la membrane (Groc, Heine et al. 2006). De plus, de nombreux travaux indiquent que les NMDAR2B se localisent de façon préférentielle dans les sites extra-synaptiques (Kohr 2006; Papouin, Ladepeche et al. 2012). Le VEGF pourrait ainsi réguler la diffusion latérale des NMDAR2B des sites extra-synaptiques vers les synapses. La diffusion des récepteurs NMDA dans la membrane est relativement rapide, avec un remplacement de 65% des récepteurs synaptiques en sept minutes (Tovar and Westbrook 2002). Cette cinétique de diffusion des récepteurs correspond au décours temporel de la réponse synaptique des NMDAR que nous avons observé en présence de VEGF. On peut penser que le VEGF augmente le temps de résidence des NMDAR2B à la synapse en se liant de manière compétitive avec les Intégrines de type  $\beta 1$ . En effet, ces Intégrines sont activées par la liaison d'une protéine de la matrice extracellulaire, la Reeline, ce qui augmente la vitesse de diffusion des NMDAR2B (Groc, Choquet et al. 2007). Comme le VEGF a la capacité de lier ces Intégrines (Hutchings, Ortega et al. 2003; Vlahakis, Young et al. 2007), il peut empêcher leur liaison avec la Reeline de manière compétitive et prévenir l'augmentation de diffusion des NMDAR2B. Cette interaction VEGF-Intégrine $\beta 1$  permettrait d'augmenter le temps de résidence des NMDAR2B à la synapse. Ainsi, la modulation de la diffusion latérale des NMDAR2B par le couple VEGF/VEGFR2 pourrait en partie expliquer l'effet du VEGF sur l'activité synaptique de ces récepteurs au glutamate.

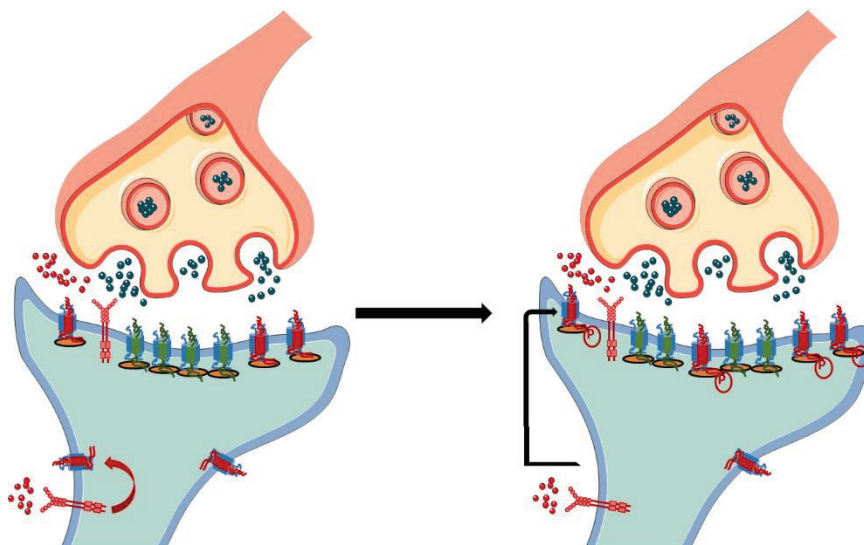
### 2) Régulation du recyclage des récepteurs : (Figure Modèle 4)

Des études récentes ont révélé que les récepteurs VEGFR2 et NMDAR2B peuvent être internalisés dans des vésicules de recyclage dont le trafic est contrôlé en partie par la protéine Rab11, de la famille des petites GTPases (Nong, Huang et al. 2004; Jopling, Odell et al. 2009). Rab11 permet en effet de conduire ces vésicules dans la voie du recyclage plutôt que dans la voie de la dégradation (Nong, Huang et al. 2004). Nos résultats montrent que VEGFR2 et NMDAR2B sont tous deux exprimés dans la densité post-synaptique des neurones hippocampiques et la co-activation des récepteurs au VEGF et au NMDA favorise leur expression post-synaptique. Cette distribution spatiale comparable des deux types de récepteurs à la surface des neurones peut suggérer l'existence d'un trafic commun qui se

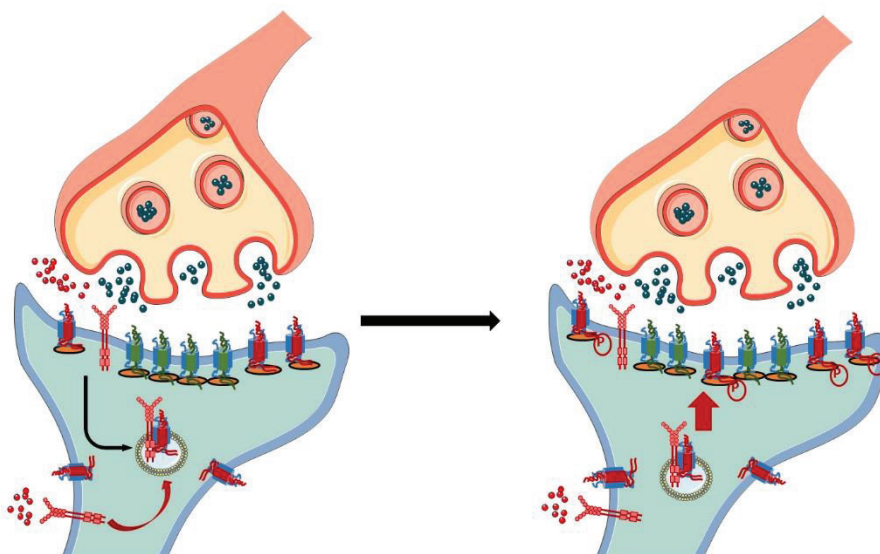
traduit par un mode d'internalisation comparable et un adressage identique vers les voies de recyclage. Comme nous l'avons évoqué précédemment les vésicules de recyclage participent à l'exocytose des NMDAR2B à la membrane (Suh, Terashima et al. 2010) et l'équilibre dynamique entre l'internalisation des récepteurs et leur recyclage permet de maintenir un pool de récepteurs approprié en surface. Le fait que l'expression en surface des NMDAR2B diminue lors d'une co-activation est en accord avec le processus d'internalisation dépendant de l'activité évoqué dans la littérature (Vissel, Krupp et al. 2001; Prybylowski, Chang et al. 2005). En revanche, l'enrichissement synaptique en NMDAR2B que nous observons avec le même traitement suppose que l'exocytose de nouveaux récepteurs compense en partie cette internalisation, et s'accompagne d'une diffusion latérale de ces récepteurs vers les synapses.

Nos résultats apparemment contradictoires pourraient être la conséquence d'une régulation fine du trafic des NMDAR2B, impliquant un processus d'internalisation lié à l'activité contrebalancé par l'exocytose de nouveaux récepteurs et leur diffusion à la synapse.





**Modèle 3: Diffusion latérale des récepteurs NMDA.** Les récepteurs NMDA diffuse librement dans la membrane plasmique avec des vitesses de diffusion et des temps de rétention à la synapse qui dépendent de la sous-unité GluN2. La voie VEGF/VEGFR2 pourrait favoriser le recrutement des récepteurs NMDAR2B à la synapse en augmentant le temps de rétention de ces récepteurs à la synapse.



**Modèle 4: Régulation du recyclage des récepteurs NMDA par VEGFR2.** Après leur activation, les récepteurs NMDA et VEGFR2 sont internalisés. Cette internalisation pourrait se faire communément, favorisant l'entrée des vésicules d'endocytose dans la voie de recyclage. La prise en charge des vésicules par Rab11 pourrait ainsi favoriser leur exocytose à la synapse, permettant le renouvellement des récepteurs NMDA et l'augmentation de leur pool synaptique.



Au potentiel de repos, les récepteurs NMDA sont bloqués par des ions magnésium logés dans le pore du canal. Ce blocage empêche les récepteurs NMDA de s'activer sans dépolarisation préliminaire de la membrane. Le VEGF, par la libération de calcium intracellulaire, pourrait favoriser cette dépolarisation première de l'élément post-synaptique et permettre la levée du blocage magnésium et l'activation des récepteurs NMDA. Cet effet pourrait ainsi amplifier l'activation des récepteurs NMDA dans le cas d'une double stimulation au VEGF et au NMDA. Cette double activation est en effet une condition nécessaire à la mise en place d'une régulation post-synaptique de l'organisation spatiale des récepteurs au glutamate. Nous avons vu que le recrutement synaptique des NMDAR2B résulte de l'activation conjointe de deux voies de signalisation engagées par le VEGF et le NMDA.

Notre étude sur l'activation des voies de signalisation induite par une stimulation au VEGF et/ou au NMDA dans les neurones hippocampiques a permis d'identifier une voie de signalisation commune : il s'agit de la calcium/calmoduline kinase II ou CaMKII. Lors d'une co-activation VEGFR/NMDAR, nous observons non seulement une translocalisation de la CaMKII aux synapses, mais également une activation importante de cette CaMKII synaptique. De nombreuses études ont montré que la CaMKII est activée par l'entrée de calcium via les récepteurs NMDAR et qu'elle se relocalise au niveau synaptique où les taux de calcium sont les plus élevés (Lemieux, Labrecque et al. 2012). Mais la CaMKII peut être également activée par la voie VEGF/VEGFR2 dans ces mêmes neurones (Kim, Choi et al. 2008). Cette activation se produit en cascade et implique initialement la PLC $\gamma$ , qui provoque une augmentation des taux de calcium intracellulaire puis l'activation de la CaMKII. Ainsi, l'augmentation de l'expression de VEGFR2 et NMDAR dans la densité postsynaptique lors d'une co-activation favoriserait une augmentation importante et localisée des taux de calcium intracellulaire, amplifiant le recrutement synaptique de la CaMKII.

La CaMKII est impliquée dans la régulation du trafic des récepteurs NMDA, et principalement des NMDAR2B (Raveendran, Devi Suma Priya et al. 2009). Elle interagit spécifiquement avec la sous-unité GluN2B de ces récepteurs ce qui favorise la persistance de son activité (Bayer, De Koninck et al. 2001). Nous observons en effet une prédominance de la forme active de la CaMKII sur la forme inhibitrice identifiée par la phosphorylation des résidus T305-306, lors d'une co-activation VEGFR/NMDAR. La liaison de la CaMKII à GluN2B dépend également de l'état de phosphorylation de cette sous-unité, en particulier sur le résidu Y1472 (Raveendran,

Devi Suma Priya et al. 2009). Or, l'activation de VEGFR2 permet de phosphoryler GluN2B sur ce résidu via les Src kinases (Meissirel, Ruiz de Almodovar et al. 2011). La co-activation VEGFR/NMDAR pourrait donc favoriser l'activation à long terme de la CaMKII et son interaction avec les récepteurs NMDAR2B, permettant de stabiliser et d'ancrer ces récepteurs à la synapse. En effet, nous savons que ces complexes CaMKII-NMDAR2B bloquent la fixation de l'AP-2 sur GluN2B et stabilise leur liaison avec la protéine d'échafaudage PSD95 (Roche, Standley et al. 2001).

## Rôle de la voie VEGF/VEGFR2 dans la mise en place de nouvelles synapses

L'activation conjointe de VEGFR2 et NMDAR induit l'augmentation du nombre de sites synaptiques identifiés par un marquage pré-synaptique (Synapsin-1) et post-synaptique (PSD95). Cette mise en place de nouvelles synapses met en jeu différents processus que je vais détailler ci-dessous afin de mieux comprendre le rôle du VEGF.

Nous avons vu dans l'introduction que la CaMKII jouait un rôle dans la mise en place et la stabilisation des synapses. En effet, sa translocalisation synaptique permet d'enrichir la densité post-synaptique en protéines d'échafaudage et en récepteurs au glutamate de type NMDA et AMPA (Oh, Derkach et al. 2006; Sanhueza, Fernandez-Villalobos et al. 2011). La CaMKII permet donc de stabiliser les synapses déjà établies, mais également de former de nouvelles synapses à partir de filopodes (Hill and Zito 2013). En accord avec ces travaux, notre étude révèle que la co-activation VEGFR/NMDAR qui provoque une activation intense de la CaMKII favorise le développement de nouvelles synapses et le renforcement des synapses déjà existantes. De plus, nos données de microscopie électronique montrent une augmentation de la taille des PSD, confirmant cet enrichissement en protéines synaptiques. Enfin, l'analyse du contenu des PSD par notre approche biochimique permet de préciser que la PSD95 est une protéine essentielle qui favorise la structuration de ces nouvelles synapses.

Le cytosquelette joue un rôle extrêmement important dans la mise en place des synapses et dans leur stabilisation (*cf* Introduction chapitre IV-3-b). En effet, l'actine permet de former et de stabiliser les épines dendritiques en favorisant l'ancrage des protéines à la densité postsynaptique. Les récepteurs NMDA exercent un rôle positif sur ce processus en stimulant l'expression de l'actine fibrillaire et sa polymérisation par inhibition de la Cofiline (Fukazawa,

Saitoh et al. 2003). VEGFR2 permet également de réguler le cytosquelette d'actine par l'activation des Src kinases (Matsumoto, Bohman et al. 2005). Dans notre modèle, la co-activation de ces deux voies stimulerait la réorganisation du cytosquelette d'actine en stabilisant les synapses existantes et favorisant la formation de nouvelles synapses. Il est intéressant de noter que, la CaMKII interagit fortement avec le cytosquelette, et principalement avec les microtubules. Le rôle exact de cette interaction n'est pas encore élucidé mais pourrait être impliqué dans la stabilisation des épines et l'expression de la LTP (Lemieux, Labrecque et al. 2012).

L'activation de la CaMKII, la formation de nouvelles synapses et la persistance de l'activité synaptique ne sont pas sans rappeler les mécanismes d'induction et d'expression de la LTP. Le VEGF pourrait donc réguler la transmission synaptique et son efficacité en favorisant l'induction et l'expression de la LTP.

### Rôle de la voie VEGF/VEGFR2 dans certaines formes de plasticité synaptique comme la LTP

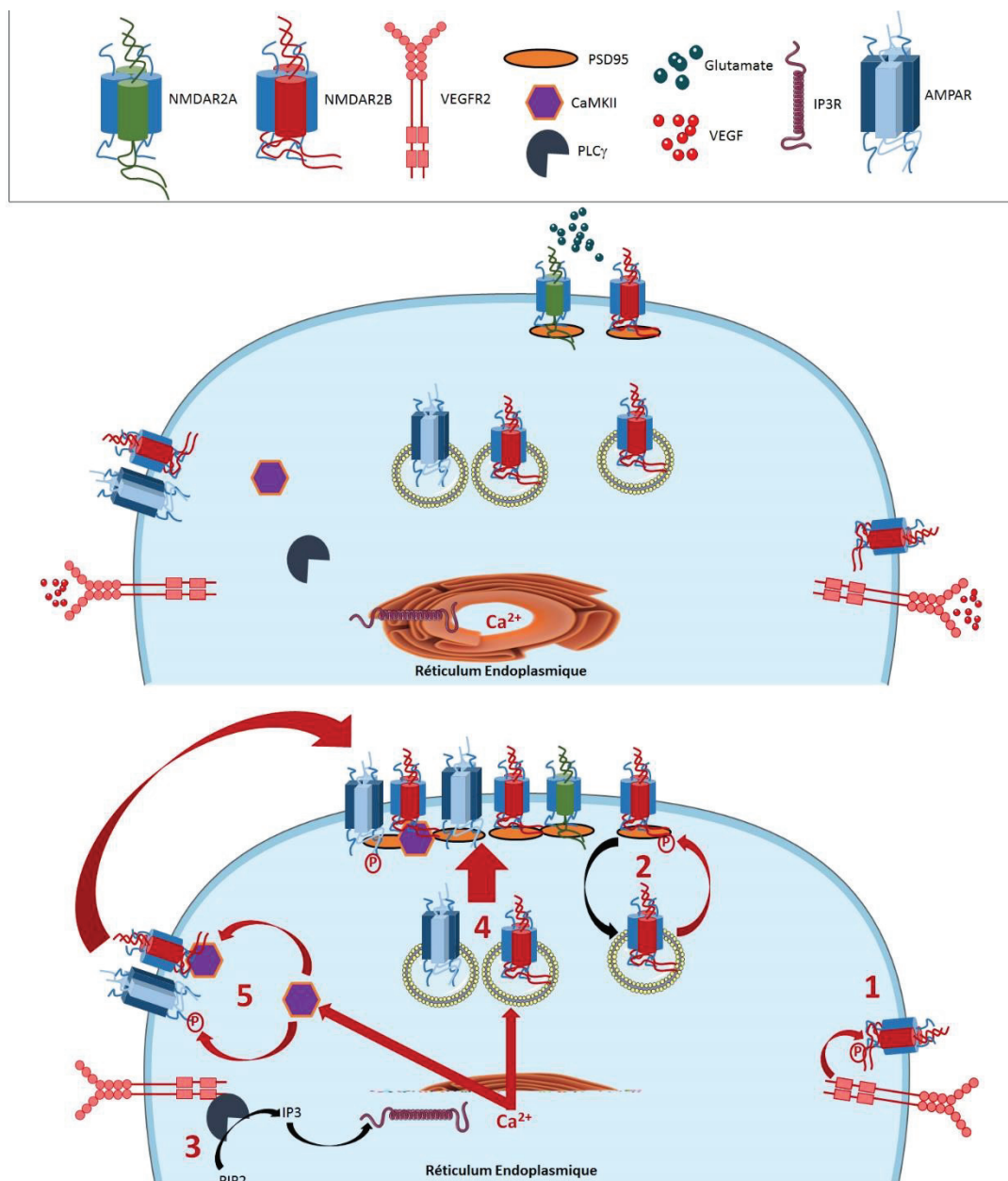
La translocation synaptique de la CaMKII (présente étude) et son activation induite par le VEGF (Kim, Choi et al. 2008) suggèrent que ce facteur participe avec les récepteurs NMDA à l'induction de la LTP. Plusieurs travaux ayant exploré l'effet du VEGF sur les neurones hippocampiques montrent son implication dans l'induction de la LTP ((Cao, Jiao et al. 2004; Kim, Choi et al. 2008; Licht, Goshen et al. 2011). Nous allons donc évoquer les modifications induites par le VEGF sur d'autres marqueurs de la LTP.

La LTP provoque une augmentation du nombre de zones actives pré-synaptiques identifiées par le marqueur pré-synaptique Synapsine-1 (Sato, Morimoto et al. 2000; Reid, Dixon et al. 2004). La probabilité de libération des vésicules de neurotransmetteur est également augmentée pendant la LTP, favorisant ainsi l'activation de synapses silencieuses (Reid, Dixon et al. 2004). De plus, la CaMKII pré-synaptique est activée lors de la LTP et cette activation dépend de la contribution des NMDAR post-synaptiques. Elle permet alors de phosphoryler la Synapsine-I de l'élément pré-synaptique et de moduler son contrôle du trafic des vésicules de libération (Nayak, Moore et al. 1996). Or, nos résultats indiquent qu'une co-activation VEGFR/NMDAR augmente à la fois le nombre de sites pré-synaptiques (Synapsin-1) et post-synaptiques (PSD95), tout en favorisant l'activation de la CaMKII postsynaptique. Il est

possible d'envisager une contribution de la voie VEGF/VEGFR2 au niveau pré-synaptique qui agirait par l'intermédiaire d'un signal rétrograde et faciliterait le recrutement de sites pré-synaptiques. Cependant, nos données électrophysiologiques avec l'absence de modification de la PPF vont à l'encontre d'un changement de la probabilité de libération du glutamate et impliquent davantage une régulation post-synaptique de la transmission synaptique. D'autre part, L'augmentation du nombre de sites pré-synaptiques que nous observons après co-activation pourrait être liée au processus de synaptogenèse qui se déroule au cours du développement. En effet, la LTP permet de favoriser l'établissement et la maturation de nouvelles synapses fonctionnelles pendant le développement (Durand, Kovalchuk et al. 1996).

Les récepteurs AMPA, notamment ceux exprimant la sous-unité GluA1, sont de bons marqueurs de la plasticité synaptique et leur expression est étroitement liée à l'activation de la CaMKII (Barria, Muller et al. 1997). C'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés à ces récepteurs glutamatergiques. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre d'introduction sur la LTP, la régulation du trafic des récepteurs AMPA est sous le contrôle de nombreux acteurs. Néanmoins, la CaMKII est une kinase essentielle impliquée dans l'expression synaptique des récepteurs AMPA et dans la régulation de leur activité. En effet, elle phosphoryle la sous-unité GluA1 des AMPAR et favorise leur translocation au niveau synaptique. Ces deux effets contribuent à amplifier l'activité synaptique des AMPAR pendant la LTP (Barria, Muller et al. 1997). Au cours du développement, cette expression synaptique des récepteurs AMPA indique le passage de l'état silencieux à l'état actif de la synapse, car ils sont les principaux récepteurs impliqués dans la transmission synaptique glutamatergique. Or, nos résultats montrent un enrichissement synaptique en récepteurs AMPA, lors de la co-activation VEGFR/NMDAR, qui pourrait résulter d'un processus de plasticité développementale et favoriser l'augmentation du nombre de synapses fonctionnelles. A cet égard, il est intéressant de noter que l'élément pré-synaptique, via la Neurexine-3, régule également la translocation synaptique des récepteurs AMPA (Aoto, Martinelli et al. 2013). Ainsi, l'augmentation du nombre de sites pré-synaptiques que nous observons pourrait participer au recrutement post-synaptique des AMPAR lors d'une co-activation.

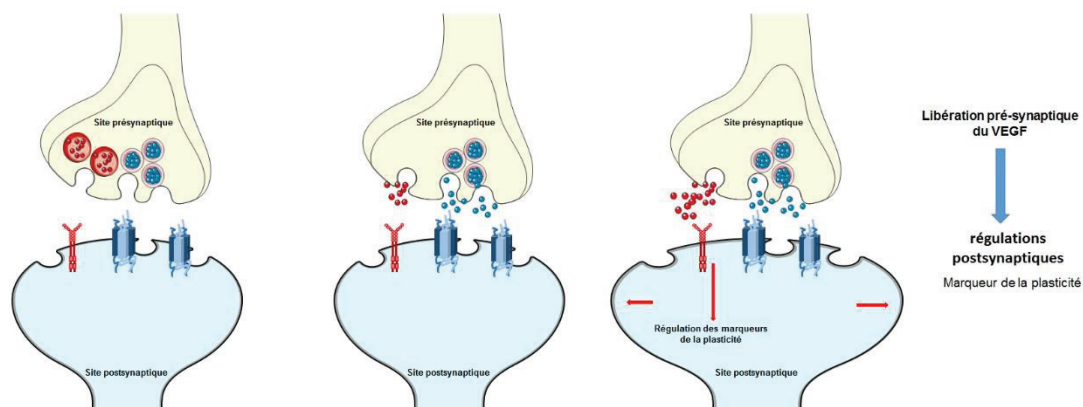
Les effets du VEGF que nous venons d'évoquer et son rôle dans l'induction de la LTP hippocampique font de la voie VEGF/VEGFR2 un acteur important dans les processus d'apprentissage et de mémorisation.



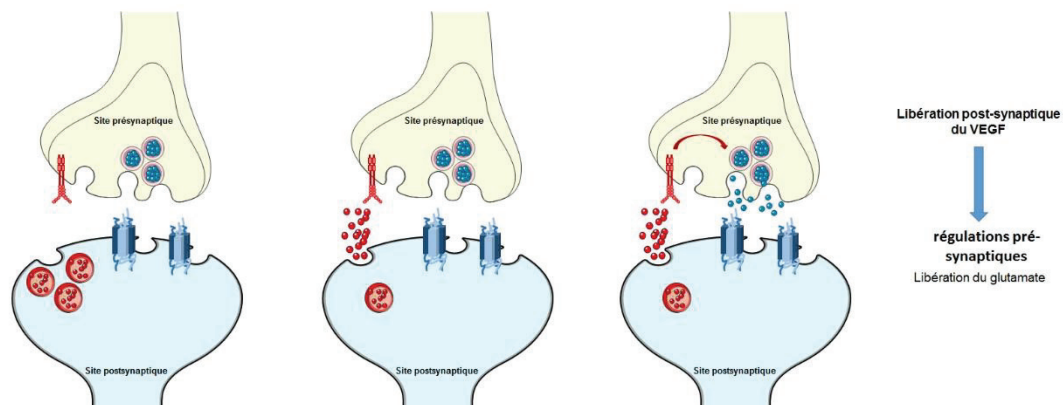
**Modèle global: Action du VEGF lors de la co-activation des récepteurs NMDA et VEGFR2.** Nos résultats suggèrent plusieurs actions possible du VEGF dans les synapses. 1) Le VEGF pourrait favoriser la phosphorylation des récepteurs NMDA sur la tyrosine 1472 de la sous-unité GluN2B, favorisant sa stabilisation en surface et son expression à la synapse. 2) le VEGF peut favoriser l'adressage des récepteurs NMDA internalisés vers de voies de recyclage impliquées dans l'exocytose de nouveaux récepteurs à la synapse. 3) L'activation du VEGFR2 permet d'activer la voie PLC $\gamma$ , ce qui favorise la libération de calcium à partir du Réticulum Endoplasmique via l'activation des récepteurs à l'IP3 (IP3R). 4) La libération de Calcium peut favoriser les processus d'exocytose, favoriser l'adressage en surface des récepteurs AMPA et NMDA. 5) l'augmentation des taux de Calcium intracellulaire va activer la CaMKII. En s'associant avec les récepteurs NMDA, elle promeut leur relocalisation à la synapse et l'augmentation de leur activité. La CaMKII peut également phosphoryler les récepteurs AMPA sur la Sérine 831, ce qui favorise leur relocalisation synaptique et augmente leur activité. L'ensemble de ces processus permet au VEGF d'augmenter l'activité post-synaptique des synapses glutamatergiques et favoriserait l'induction et l'expression de la LTP.



A



B



**Figure 11: Sites de libération du VEGF.** **A)** Le VEGF peut être libéré au niveau pré-synaptique de façon concomitante au neurotransmetteur. Il pourrait induire la régulation de différents mécanismes au niveau post-synaptique comme l'élargissement des épines ou l'expression de la LTP. **B)** Le VEGF peut être libéré au niveau des sites post-synaptiques en réponse à l'activité NMDA. La libération à ce niveau pourrait réguler l'activité de l'élément pré-synaptique en réalisant un rétro-contrôle, positif en augmentant la libération de glutamate, négatif en diminuant l'exocytose dans la fente synaptique. Ce système pourrait alors moduler la réponse glutamatergique en fonction des conditions.

## Libération physiologique du VEGF à la synapse

Le site de libération physiologique du VEGF est une question importante. En effet, notre étude s'appuie sur l'application de VEGF exogène. Néanmoins, le VEGF est exprimé par les neurones de l'hippocampe (Licht and Keshet 2013) et peut être libéré après activation de ces neurones par le glutamate (Kim, Choi et al. 2008). De plus, l'activité des récepteurs NMDA est impliquée dans la synthèse neuronale du VEGF et sa libération (Kim, Choi et al. 2008). Ceci suggère que l'activité post-synaptique des NMDAR facilite la libération du VEGF qui peut alors agir de manière autocrine sur les récepteurs VEGFR2 post-synaptiques et amplifier la transmission synaptique. Le VEGF pourrait également se fixer sur l'élément pré-synaptique et exercer un rétrocontrôle sur l'activité neuronale. Enfin, on ne peut exclure la possibilité que le VEGF soit libéré par les sites pré-synaptiques et exerce une fonction paracrine sur le neurone post-synaptique (Figure 11).

Le VEGF peut également être libéré par d'autres types cellulaires pour avoir une action paracrine sur les neurones. Les cellules endothéliales peuvent bien évidemment participer à la libération de VEGF. Cependant, le rôle du VEGF - via les vaisseaux sanguins - dans les processus d'apprentissage et de mémorisation reste à ce jour un sujet controversé (Licht, Goshen et al. 2011). La contribution du système vasculaire peut s'opérer à deux niveaux. D'une part, ce système exerce une fonction métabolique nécessaire à l'activité neuronale avec l'apport d'oxygène et de nutriments aux cellules nerveuses, D'autre part, il fournit des facteurs de croissance impliqués dans les processus de plasticité, dans notre cas, le VEGF. Pour cette raison, des modèles d'études *in vitro* et *in vivo* commencent à être développer afin d'évaluer la contribution exacte du système vasculaire. Enfin, le VEGF peut être libéré par les pieds astrocytaires englobant les synapses car les cellules gliales sont capables de synthétiser et d'exprimer le VEGF (Saito, Shibasaki et al. 2011). Cette libération pourrait alors jouer un rôle paracrine à la fois sur l'élément pré-synaptique en contrôlant la libération de neurotransmetteur, et sur l'élément post-synaptique en favorisant la réorganisation des récepteurs synaptiques et l'activation de voies intracellulaires spécifiques.



## Rôle de la voie VEGF/VEGFR2 dans l'apprentissage et la consolidation mnésique

Les études indépendantes de Cao et Licht démontrent le rôle joué par le VEGF dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (Cao, Jiao et al. 2004; Licht, Goshen et al. 2011). Néanmoins, une incertitude demeure sur l'impact direct du VEGF dans l'activité des réseaux hippocampiques adultes, indépendamment de son action sur la neurogenèse et sur la vascularisation. Pour résoudre cette question, nous avons exploré le rôle de la voie VEGF/VEGFR2 chez des souris déficientes en VEGFR2 dans les cellules neurales. Nous avons choisi d'utiliser le test de Fear Conditioning pour évaluer l'impact de cette déficience sur les performances mnésiques. Nos résultats, bien que préliminaires, suggèrent une perturbation de la consolidation d'un apprentissage associatif lié au contexte qui dépend de l'hippocampe. Ces résultats pourraient, sous réserve de confirmation, démontrer le rôle direct du couple VEGF/VEGFR2 dans le traitement de l'information dans l'hippocampe et souligner son impact sur la mémorisation des apprentissages de type associatif. Il restera à déterminer si cet effet peut se généraliser à d'autres types d'apprentissage comme l'apprentissage spatial évoqué dans l'étude de Cao (Cao, Jiao et al. 2004). En effet, une étude récente a montré que les récepteurs NMDAR2B participent à la mémorisation à court terme d'un apprentissage spatial dépendant de l'hippocampe (von Engelhardt, Doganci et al. 2008). Ainsi, la voie VEGF/VEGFR2 pourrait en association avec les récepteurs NMDAR2B favoriser ce type d'apprentissage et leur mémorisation. Cependant, on ne peut pas exclure la possibilité qu'une réorganisation des réseaux hippocampiques se produise au cours du développement dans notre modèle de souris mutante. En effet, ces souris génétiquement modifiées ne sont pas inductibles, et la délétion du VEGFR2 est effective dès les premiers stades embryonnaires. Or, le VEGFR2 joue un rôle central dans la mise en place du fornix postcommissural (Bellon, Luchino et al. 2010) et sa délétion aux stades embryonnaires peut altérer la mise en place de réseaux neuronaux essentiels aux processus d'apprentissage et de mémorisation. De plus, comme le système nerveux participe de façon active au développement de sa vascularisation, un défaut de vascularisation précoce de l'hippocampe pourrait compliquer l'interprétation de nos résultats. Enfin, il est important de noter que dans notre modèle d'invalidation, l'absence de VEGFR2 affecte les neurones comme les cellules gliales. Si l'expression d'autres récepteurs au VEGF, comme VEGFR1, est prédominante dans les cellules gliales (Wittko-Schneider, Schneider et al.

2013), on ne peut exclure l'éventualité d'une altération de la signalisation gliale dans notre modèle de souris mutante. Pour pallier ces inconvénients, nous développons actuellement une stratégie de transfert de gènes via des AAV recombinants qui codent pour un ShRNA dirigé contre VEGFR2. Cette approche alternative nous permettra de bloquer l'expression de VEGFR2 dans une région précise du cerveau et uniquement à l'âge adulte.

Notre étude comportementale suggère que le déficit de mémorisation des apprentissages associatifs chez les souris déficientes en VEGFR2 affecte d'autres structures que l'hippocampe, comme l'amygdale. Ainsi, la coopération que nous avons mis à jour entre les voies VEGF/VEGFR2 et NMDAR pourrait se généraliser à d'autres processus de plasticité dans d'autres systèmes, comme par exemple chez la drosophile. Chez cette mouche, on observe des phénomènes de plasticité dépendant des récepteurs NMDA qui se traduisent par une modulation du comportement de phototaxie (Zhou, Lei et al. 2010). Ce modèle animal simplifié présente l'intérêt d'exprimer le PVF, un analogue du VEGF, et son récepteur Pvr, et d'être dépourvu d'un système vasculaire spécialisé, écartant ainsi la possibilité d'un biais d'interprétation. Nous avons donc utilisé des souches mutantes pour Pvr afin d'explorer le rôle du PVF dans les phénomènes de plasticité liés au comportement de phototaxie. Nos résultats montrent que l'absence du récepteur au PVF comme celle du récepteur NMDA, empêche l'expression de la phototaxie et perturbe les processus de plasticité liés à l'expérience visuelle. Ces résultats évoquent la possibilité d'une participation de la voie VEGF/VEGFR2 à l'ensemble des processus de plasticité dépendant des récepteurs NMDA. A cet égard, il est intéressant de souligner que la CaMKII régule la plasticité synaptique et la dynamique des épines dendritiques chez la drosophile (Griffith 1997; Andersen, Li et al. 2005). Il est donc plausible d'imaginer que la phototaxie fasse intervenir la voie CaMKII sous le contrôle d'une activation conjointe des récepteurs NMDAR et Pvr.

### Implication de la voie VEGF/VEGFR2 dans les pathologies de la mémoire

L'invalidation de VEGFR2 par transfert de gènes chez le rat perturbe l'acquisition d'un apprentissage et la mémoire (Cao, Jiao et al. 2004). De plus, l'administration d'un produit bloquant la signalisation du VEGFR2, dans le cadre de la chimiothérapie des cancers du poumon et du colon, altère la rétention de la mémoire spatiale chez le rat (Pati, Orsi et al.

2009). Ces différentes études suggèrent donc que le VEGF est impliqué dans des pathologies de la mémoire, via son action sur VEGFR2.

La dépression est une pathologie multifactorielle associée à un dysfonctionnement de la mémoire et des troubles de l'humeur, qui induit une diminution du volume de certaines structures cérébrales dont l'hippocampe. Des études récentes ont mis en cause des polymorphismes du VEGF (Galecki, Galecka et al. 2013) et de VEGFR2 (Galecki, Orzechowska et al. 2013) dans le développement de cette maladie. Ces différents polymorphismes peuvent être associés à une résistance au traitement de la dépression (Viikki, Anttila et al. 2010). Le rôle du VEGF dans cette pathologie est principalement relié à son action sur la neurogenèse (Fournier and Duman 2012). De plus, les voies induites par le VEGF, comme les voies mTor et AMPc, sont impliquées dans l'efficacité des traitements antidépresseurs (Lee, Jang et al. 2009; Elfving and Wegener 2012). Parallèlement, on observe que la kétamine, un antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA, constitue un bon traitement antidépresseur. Enfin, différents polymorphismes de la sous-unité GluN2B sont reliés à une susceptibilité de développer une dépression (Zhang, Li et al. 2013). Ces différentes études suggèrent donc la possibilité d'une coopération entre les voies NMDAR et VEGF/VEGFR2 dans le développement et le traitement de la dépression. La perturbation de cette coopération pourrait être à l'origine des problèmes mnésiques chez les personnes dépressives.

La schizophrénie est une pathologie caractérisée par des troubles multiples du comportement associés à des déficits mnésiques, qui implique en partie l'hippocampe. Les récepteurs NMDA ont depuis longtemps été identifiés comme des acteurs clés du développement de cette maladie. En effet, la schizophrénie se traduit par une hypo-fonction des récepteurs NMDA, probablement en raison d'une diminution des récepteurs NMDA présents à la surface des neurones (Tsai and Coyle 2002; Tang, Yang et al. 2009). L'hypo-fonction des récepteurs NMDA est reliée à différents polymorphismes de la sous unité GluN2B (Liou, Wang et al. 2007; Weickert, Fung et al. 2013). Les voies intracellulaires responsables du trafic des récepteurs NMDAR2B sont affectées dans le cerveau des schizophrènes, expliquant en partie l'altération de la fonction des récepteurs NMDA (Kristiansen, Bakir et al. 2010). A ce jour, une seule étude a mis en évidence une diminution des taux d'ARNm du VEGF chez les patients atteints de schizophrénie (Fulzele and Pillai 2009). Ces études viennent corroborer nos résultats sur le rôle du VEGF dans la régulation du trafic des récepteurs NMDAR2B dans l'hippocampe. Ainsi,

la diminution des taux de VEGF pourrait provoquer une altération du trafic des NMDAR2B et être à l'origine de l'hypo-fonction des récepteurs NMDA.

La maladie d'Alzheimer est une pathologie du vieillissement bien connue avec des origines génétiques et environnementales. Les patients présentent des déficits mnésiques importants qui se traduisent initialement par une perte de la mémoire à court terme puis progressivement par une perte de la mémoire à plus long terme. L'implication des récepteurs NMDA dans cette pathologie est maintenant connue depuis de nombreuses années (Malinow 2012). Le rôle du VEGF est quant à lui plus difficile à définir : des facteurs de risques d'ordre génétique (Del Bo, Ghezzi et al. 2009; Liu, Zeng et al. 2013), et des dysfonctionnements vasculaires ont été évoqués (Pimentel-Coelho and Rivest 2012). Si l'action du VEGF commence à être explorée sur l'intégrité et la fonction du système vasculaire dans des modèles animaux de cette pathologie (Religa, Cao et al. 2013), son effet sur le fonctionnement neuronal reste à déterminer. En particulier, il serait intéressant d'étudier dans ces modèles l'impact d'une coopération entre les voies NMDAR et VEGF/VEGFR2 dans la synaptogenèse, la neurogenèse et la mort cellulaire d'une part et dans l'activation des voies de survie et de plasticité d'autre part.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'exercice permet de favoriser les processus d'apprentissage et de mémorisation. Différentes études ont montré que l'exercice régulier permet d'amplifier l'activation de la voie VEGF/VEGFR2 et de stimuler la neurogenèse (Fabel, Tam et al. 2003; Kiuchi, Lee et al. 2012). Ces pistes de traitements alternatifs semblent prometteuses et soutiennent l'hypothèse d'un rôle important du VEGF dans les processus mnésiques.

## Perspectives

Notre travail a donc permis de répondre à certaines questions concernant le rôle du VEGF dans la fonction de la synapse glutamatergique lors de la transmission synaptique et son effet sur certains processus de plasticité et d'apprentissage. Nos résultats ouvrent de nouvelles questions qui pourraient faire l'objet d'études à venir.

Tout d'abord, il semble important de résoudre la question du rôle du système vasculaire dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. Nous développons actuellement des vecteurs adénoviraux recombinants ciblant le VEGFR2 (AAV-ShFlk1). Leur injection

stéréotaxique dans l'hippocampe permettra de nous affranchir des réorganisations développementales présentes dans le modèle de souris génétiquement modifiée que nous avons utilisé. Les AAV présentent un deuxième avantage : l'enveloppe du virus permet de cibler le type cellulaire souhaité. Ainsi, nous pourrions inhiber l'expression de VEGFR2 principalement dans les neurones de l'hippocampe chez la souris adulte. De plus, l'équipe d'Amparo Aker-Palmer de l'Université de Francfort, avec qui nous collaborons pour l'étude comportementale de la voie VEGF/VEGFR2, développe actuellement des modèles de souris transgéniques où la délétion de VEGFR2 est sous contrôle du promoteur CaMKII. Ce promoteur permet de restreindre la délétion aux neurones du cerveau antérieur sans affecter les autres régions du cerveau ni les autres types cellulaires. Coupler l'ensemble de ces modèles permettrait d'avoir une idée plus précise sur l'impact du VEGF dans les processus de plasticité et les processus mnésiques.

Ensuite, il semble essentiel d'identifier les sites physiologiques de libération du VEGF lors de l'activité neuronale. Connaître ces sites améliorera notre compréhension du rôle du VEGF sur les neurones. L'utilisation de bloqueurs d'exocytose ou le ciblage de moteurs moléculaires spécifiques semble être une approche prometteuse. L'adaptation des différentes techniques mises en œuvre pour l'étude du Brain-Derived Neurotrophic factor (BDNF) pourrait s'avérer utile.

## Conclusion

De nombreuses études se sont attachées à démontrer son rôle trophique, son effet sur le guidage neuronal et son impact dans les processus mnésiques. Notre étude a identifié pour la première fois les mécanismes moléculaires mis en jeu dans le remodelage synaptique lié à l'activité de la synapse glutamatergique. D'autres études doivent être réalisées afin d'affiner notre compréhension du mode d'action du VEGF dans les processus synaptiques, que ce soit en condition normale ou pathologique.





# BIBLIOGRAPHIE

- Abel, T., P. V. Nguyen, et al. (1997). "Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory." *Cell* **88**(5): 615-626.
- Abeliovich, A., R. Paylor, et al. (1993). "PKC gamma mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning." *Cell* **75**(7): 1263-1271.
- Abraham, W. C. and G. V. Goddard (1983). "Asymmetric relationships between homosynaptic long-term potentiation and heterosynaptic long-term depression." *Nature* **305**(5936): 717-719.
- Adams, R. H., G. A. Wilkinson, et al. (1999). "Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis." *Genes Dev* **13**(3): 295-306.
- Ahmad, M., J. S. Polepalli, et al. (2012). "Postsynaptic complexin controls AMPA receptor exocytosis during LTP." *Neuron* **73**(2): 260-267.
- Akashi, K., T. Kakizaki, et al. (2009). "NMDA receptor GluN2B (GluR epsilon 2/NR2B) subunit is crucial for channel function, postsynaptic macromolecular organization, and actin cytoskeleton at hippocampal CA3 synapses." *J Neurosci* **29**(35): 10869-10882.
- Al-Hallaq, R. A., T. P. Conrads, et al. (2007). "NMDA di-heteromeric receptor populations and associated proteins in rat hippocampus." *J Neurosci* **27**(31): 8334-8343.
- Altman, J. and G. D. Das (1965). "Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats." *J Comp Neurol* **124**(3): 319-335.
- Andersen, R., Y. Li, et al. (2005). "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alters structural plasticity and cytoskeletal dynamics in Drosophila." *J Neurosci* **25**(39): 8878-8888.
- Antequera, D., A. Portero, et al. (2012). "Encapsulated VEGF-secreting cells enhance proliferation of neuronal progenitors in the hippocampus of AbetaPP/Ps1 mice." *J Alzheimers Dis* **29**(1): 187-200.
- Aoto, J., D. C. Martinelli, et al. (2013). "Presynaptic neurexin-3 alternative splicing trans-synaptically controls postsynaptic AMPA receptor trafficking." *Cell* **154**(1): 75-88.
- Arany, Z., S. Y. Foo, et al. (2008). "HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha." *Nature* **451**(7181): 1008-1012.
- Atasoy, D., S. Schoch, et al. (2007). "Deletion of CASK in mice is lethal and impairs synaptic function." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(7): 2525-2530.
- Atkins, C. M., M. A. Davare, et al. (2005). "Bidirectional regulation of cytoplasmic polyadenylation element-binding protein phosphorylation by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and protein phosphatase 1 during hippocampal long-term potentiation." *J Neurosci* **25**(23): 5604-5610.
- Autiero, M., F. De Smet, et al. (2005). "Role of neural guidance signals in blood vessel navigation." *Cardiovasc Res* **65**(3): 629-638.
- Autiero, M., J. Waltenberger, et al. (2003). "Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1." *Nat Med* **9**(7): 936-943.
- Azzouz, M., G. S. Ralph, et al. (2004). "VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model." *Nature* **429**(6990): 413-417.



- Bach, M. E., R. D. Hawkins, et al. (1995). "Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency." *Cell* **81**(6): 905-915.
- Bagnard, D., C. Vaillant, et al. (2001). "Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor." *J Neurosci* **21**(10): 3332-3341.
- Ballmer-Hofer, K., A. E. Andersson, et al. (2011). "Neuropilin-1 promotes VEGFR-2 trafficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output." *Blood* **118**(3): 816-826.
- Barria, A. and R. Malinow (2002). "Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses." *Neuron* **35**(2): 345-353.
- Barria, A. and R. Malinow (2005). "NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII." *Neuron* **48**(2): 289-301.
- Barria, A., D. Muller, et al. (1997). "Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation." *Science* **276**(5321): 2042-2045.
- Barros, C. S., S. J. Franco, et al. (2011). "Extracellular matrix: functions in the nervous system." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(1): a005108.
- Barrow, S. L., J. R. Constable, et al. (2009). "Neurologin1: a cell adhesion molecule that recruits PSD-95 and NMDA receptors by distinct mechanisms during synaptogenesis." *Neural Dev* **4**: 17.
- Bashir, Z. I., Z. A. Bortolotto, et al. (1993). "Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors." *Nature* **363**(6427): 347-350.
- Bates, D. O., T. G. Cui, et al. (2002). "VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma." *Cancer Res* **62**(14): 4123-4131.
- Bats, C., L. Groc, et al. (2007). "The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking." *Neuron* **53**(5): 719-734.
- Bayer, K. U., P. De Koninck, et al. (2001). "Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation." *Nature* **411**(6839): 801-805.
- Bayer, K. U., E. LeBel, et al. (2006). "Transition from reversible to persistent binding of CaMKII to postsynaptic sites and NR2B." *J Neurosci* **26**(4): 1164-1174.
- Bekkers, J. M. and C. F. Stevens (1990). "Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus." *Nature* **346**(6286): 724-729.
- Bellon, A., J. Luchino, et al. (2010). "VEGFR2 (KDR/Flk1) signaling mediates axon growth in response to semaphorin 3E in the developing brain." *Neuron* **66**(2): 205-219.
- Berberich, S., P. Punnakal, et al. (2005). "Lack of NMDA receptor subtype selectivity for hippocampal long-term potentiation." *J Neurosci* **25**(29): 6907-6910.
- Bhattacharyya, S., V. Biou, et al. (2009). "A critical role for PSD-95/AKAP interactions in endocytosis of synaptic AMPA receptors." *Nat Neurosci* **12**(2): 172-181.
- Bliss, T. V. and G. L. Collingridge (2013). "Expression of NMDA receptor-dependent LTP in the hippocampus: bridging the divide." *Mol Brain* **6**: 5.
- Bliss, T. V. and T. Lomo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." *J Physiol* **232**(2): 331-356.
- Blitzer, R. D., O. Gil, et al. (1990). "Long-term potentiation in rat hippocampus is inhibited by low concentrations of ethanol." *Brain Res* **537**(1-2): 203-208.

- Bocker-Meffert, S., P. Rosenstiel, et al. (2002). "Erythropoietin and VEGF promote neural outgrowth from retinal explants in postnatal rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(6): 2021-2026.
- Boeckers, T. M. (2006). "The postsynaptic density." Cell Tissue Res **326**(2): 409-422.
- Boehm, J., M. G. Kang, et al. (2006). "Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1." Neuron **51**(2): 213-225.
- Bohme, G. A., C. Bon, et al. (1993). "Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(19): 9191-9194.
- Bolshakov, V. Y., H. Golan, et al. (1997). "Recruitment of new sites of synaptic transmission during the cAMP-dependent late phase of LTP at CA3-CA1 synapses in the hippocampus." Neuron **19**(3): 635-651.
- Bortolotto, Z. A., Z. I. Bashir, et al. (1994). "A molecular switch activated by metabotropic glutamate receptors regulates induction of long-term potentiation." Nature **368**(6473): 740-743.
- Bouzioukh, F., G. Daoudal, et al. (2006). "Semaphorin3A regulates synaptic function of differentiated hippocampal neurons." Eur J Neurosci **23**(9): 2247-2254.
- Bredt, D. S. and R. A. Nicoll (2003). "AMPA receptor trafficking at excitatory synapses." Neuron **40**(2): 361-379.
- Breier, G., U. Albrecht, et al. (1992). "Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation." Development **114**(2): 521-532.
- Brockington, A., C. Lewis, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor and the nervous system." Neuropathol Appl Neurobiol **30**(5): 427-446.
- Buchs, P. A. and D. Muller (1996). "Induction of long-term potentiation is associated with major ultrastructural changes of activated synapses." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 8040-8045.
- Budreck, E. C., O. B. Kwon, et al. (2013). "Neuroigin-1 controls synaptic abundance of NMDA-type glutamate receptors through extracellular coupling." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(2): 725-730.
- Byzova, T. V., C. K. Goldman, et al. (2000). "A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins." Mol Cell **6**(4): 851-860.
- Caldeira, M. V., C. V. Melo, et al. (2007). "Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression and synaptic delivery of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits in hippocampal neurons." J Biol Chem **282**(17): 12619-12628.
- Calvo, C. F., R. H. Fontaine, et al. (2011). "Vascular endothelial growth factor receptor 3 directly regulates murine neurogenesis." Genes Dev **25**(8): 831-844.
- Cammalleri, M., D. Martini, et al. (2011). "Vascular endothelial growth factor up-regulation in the mouse hippocampus and its role in the control of epileptiform activity." Eur J Neurosci **33**(3): 482-498.
- Cao, L., X. Jiao, et al. (2004). "VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory." Nat Genet **36**(8): 827-835.
- Carmeliet, P. (2003). "Angiogenesis in health and disease." Nat Med **9**(6): 653-660.
- Carmeliet, P. (2003). "Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases." Nat Rev Genet **4**(9): 710-720.
- Carmeliet, P., V. Ferreira, et al. (1996). "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele." Nature **380**(6573): 435-439.

- Carmeliet, P., M. G. Lampugnani, et al. (1999). "Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis." *Cell* **98**(2): 147-157.
- Carmeliet, P., Y. S. Ng, et al. (1999). "Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188." *Nat Med* **5**(5): 495-502.
- Carmeliet, P. and M. Tessier-Lavigne (2005). "Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring." *Nature* **436**(7048): 193-200.
- Carroll, R. C., D. V. Lissin, et al. (1999). "Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures." *Nat Neurosci* **2**(5): 454-460.
- Castillo, P. E., S. Schoch, et al. (2002). "RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation." *Nature* **415**(6869): 327-330.
- Chao, H. W., C. J. Hong, et al. (2008). "SUMOylation of the MAGUK protein CASK regulates dendritic spinogenesis." *J Cell Biol* **182**(1): 141-155.
- Chauvet, S., K. Burk, et al. (2013). "Navigation rules for vessels and neurons: cooperative signaling between VEGF and neural guidance cues." *Cell Mol Life Sci* **70**(10): 1685-1703.
- Chen, B. S. and K. W. Roche (2007). "Regulation of NMDA receptors by phosphorylation." *Neuropharmacology* **53**(3): 362-368.
- Chen, B. S., E. V. Thomas, et al. (2011). "NMDA receptor-dependent regulation of dendritic spine morphology by SAP102 splice variants." *J Neurosci* **31**(1): 89-96.
- Chen, C. C., J. K. Wu, et al. (2012). "Visualizing long-term memory formation in two neurons of the Drosophila brain." *Science* **335**(6069): 678-685.
- Cheng, G., X. W. Rong, et al. (1994). "Block of induction and maintenance of calcium-induced LTP by inhibition of protein kinase C in postsynaptic neuron in hippocampal CA1 region." *Brain Res* **646**(2): 230-234.
- Cheng, H. W., A. F. James, et al. (2006). "VEGF activates receptor-operated cation channels in human microvascular endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(8): 1768-1776.
- Chiodelli, P., S. Mitola, et al. (2011). "Heparan sulfate proteoglycans mediate the angiogenic activity of the vascular endothelial growth factor receptor-2 agonist gremlin." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**(12): e116-127.
- Cho, Y. H., K. P. Giese, et al. (1998). "Abnormal hippocampal spatial representations in alphaCaMKII286A and CREBalphaDelta- mice." *Science* **279**(5352): 867-869.
- Chow, J., O. Ogunshola, et al. (2001). "Astrocyte-derived VEGF mediates survival and tube stabilization of hypoxic brain microvascular endothelial cells in vitro." *Brain Res Dev Brain Res* **130**(1): 123-132.
- Clayton, D. A., M. H. Mesches, et al. (2002). "A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat." *J Neurosci* **22**(9): 3628-3637.
- Colamarino, S. A. and M. Tessier-Lavigne (1995). "The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons." *Cell* **81**(4): 621-629.
- Colbran, R. J. (1993). "Inactivation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II by basal autophosphorylation." *J Biol Chem* **268**(10): 7163-7170.
- Colley, P. A., F. S. Sheu, et al. (1990). "Inhibition of protein kinase C blocks two components of LTP persistence, leaving initial potentiation intact." *J Neurosci* **10**(10): 3353-3360.

- Costa, C., A. Tozzi, et al. (2011). "A critical role of NO/cGMP/PKG dependent pathway in hippocampal post-ischemic LTP: modulation by zonisamide." *Neurobiol Dis* **44**(2): 185-191.
- Coultrap, S. J. and K. U. Bayer (2012). "CaMKII regulation in information processing and storage." *Trends Neurosci* **35**(10): 607-618.
- Cousins, S. L. and F. A. Stephenson (2012). "Identification of N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor subtype-specific binding sites that mediate direct interactions with scaffold protein PSD-95." *J Biol Chem* **287**(16): 13465-13476.
- Cross, M. J., J. Dixelius, et al. (2003). "VEGF-receptor signal transduction." *Trends Biochem Sci* **28**(9): 488-494.
- Cui, Z., R. Feng, et al. (2013). "Increased NR2A:NR2B ratio compresses long-term depression range and constrains long-term memory." *Sci Rep* **3**: 1036.
- Curzon, P., N. R. Rustay, et al. (2009). "Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents." Darland, D. C., J. T. Cain, et al. (2011). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform regulation of early forebrain development." *Dev Biol* **358**(1): 9-22.
- Davis, S., S. P. Butcher, et al. (1992). "The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro." *J Neurosci* **12**(1): 21-34.
- De Roo, M., P. Klauser, et al. (2008). "LTP promotes a selective long-term stabilization and clustering of dendritic spines." *PLoS Biol* **6**(9): e219.
- de Wit, J., E. Sylwestrak, et al. (2009). "LRRTM2 interacts with Neurexin1 and regulates excitatory synapse formation." *Neuron* **64**(6): 799-806.
- Dean, C., H. Liu, et al. (2009). "Synaptotagmin-IV modulates synaptic function and long-term potentiation by regulating BDNF release." *Nat Neurosci* **12**(6): 767-776.
- Del Bo, R., S. Ghezzi, et al. (2009). "VEGF genetic variability is associated with increased risk of developing Alzheimer's disease." *J Neurol Sci* **283**(1-2): 66-68.
- Derkach, V., A. Barria, et al. (1999). "Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(6): 3269-3274.
- Desmond, N. L. and W. B. Levy (1986). "Changes in the numerical density of synaptic contacts with long-term potentiation in the hippocampal dentate gyrus." *J Comp Neurol* **253**(4): 466-475.
- Dickson, B. J. (2002). "Molecular mechanisms of axon guidance." *Science* **298**(5600): 1959-1964.
- Dityatev, A. and M. Schachner (2006). "The extracellular matrix and synapses." *Cell Tissue Res* **326**(2): 647-654.
- Dixelius, J., T. Makinen, et al. (2003). "Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites." *J Biol Chem* **278**(42): 40973-40979.
- Dosemeci, A., A. J. Makusky, et al. (2007). "Composition of the synaptic PSD-95 complex." *Mol Cell Proteomics* **6**(10): 1749-1760.
- Dougher, M. and B. I. Terman (1999). "Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization." *Oncogene* **18**(8): 1619-1627.
- Duchek, P., K. Somogyi, et al. (2001). "Guidance of cell migration by the Drosophila PDGF/VEGF receptor." *Cell* **107**(1): 17-26.

- Dudek, S. M. and M. F. Bear (1992). "Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): 4363-4367.
- Dumont, D. J., L. Jussila, et al. (1998). "Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3." Science **282**(5390): 946-949.
- Dunwiddie, T. V. and G. Lynch (1979). "The relationship between extracellular calcium concentrations and the induction of hippocampal long-term potentiation." Brain Res **169**(1): 103-110.
- Durand, G. M., Y. Kovalchuk, et al. (1996). "Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus." Nature **381**(6577): 71-75.
- During, M. J. and L. Cao (2006). "VEGF, a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis." Curr Alzheimer Res **3**(1): 29-33.
- Ehlers, M. D. (2003). "Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system." Nat Neurosci **6**(3): 231-242.
- Eichenbaum, H. (2013). "Memory on time." Trends Cogn Sci **17**(2): 81-88.
- El-Husseini, A. E., E. Schnell, et al. (2000). "PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses." Science **290**(5495): 1364-1368.
- El Gaamouch, F., A. Buisson, et al. (2012). "Interaction between alphaCaMKII and GluN2B controls ERK-dependent plasticity." J Neurosci **32**(31): 10767-10779.
- Elfving, B. and G. Wegener (2012). "Electroconvulsive seizures stimulate the vegf pathway via mTORC1." Synapse **66**(4): 340-345.
- Elgersma, Y., N. B. Fedorov, et al. (2002). "Inhibitory autophosphorylation of CaMKII controls PSD association, plasticity, and learning." Neuron **36**(3): 493-505.
- Elias, G. M. and R. A. Nicoll (2007). "Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins." Trends Cell Biol **17**(7): 343-352.
- Emptage, N. J., C. A. Reid, et al. (2003). "Optical quantal analysis reveals a presynaptic component of LTP at hippocampal Schaffer-associational synapses." Neuron **38**(5): 797-804.
- Eriksson, A., R. Cao, et al. (2003). "Small GTP-binding protein Rac is an essential mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial fenestrations and vascular permeability." Circulation **107**(11): 1532-1538.
- Erskine, L., S. Reijntjes, et al. (2011). "VEGF signaling through neuropilin 1 guides commissural axon crossing at the optic chiasm." Neuron **70**(5): 951-965.
- Esser, S., M. G. Lampugnani, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells." J Cell Sci **111** ( Pt 13): 1853-1865.
- Esser, S., K. Wolburg, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro." J Cell Biol **140**(4): 947-959.
- Fabel, K., B. Tam, et al. (2003). "VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis." Eur J Neurosci **18**(10): 2803-2812.
- Faehling, M., E. D. Koch, et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor-A activates Ca<sup>2+</sup> -activated K<sup>+</sup> channels in human endothelial cells in culture." Int J Biochem Cell Biol **33**(4): 337-346.
- Fantin, A., J. M. Vieira, et al. (2013). "NRP1 acts cell autonomously in endothelium to promote tip cell function during sprouting angiogenesis." Blood **121**(12): 2352-2362.



- Fernandez-Monreal, M., T. C. Brown, et al. (2012). "The balance between receptor recycling and trafficking toward lysosomes determines synaptic strength during long-term depression." J Neurosci **32**(38): 13200-13205.
- Ferrara, N., K. Carver-Moore, et al. (1996). "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene." Nature **380**(6573): 439-442.
- Ferrara, N. and W. J. Henzel (1989). "Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **161**(2): 851-858.
- Fischer, S., H. S. Sharma, et al. (1995). "Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in pig cerebral microvascular endothelial cells and its upregulation by adenosine." Brain Res Mol Brain Res **28**(1): 141-148.
- Flamme, I., G. Breier, et al. (1995). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo." Dev Biol **169**(2): 699-712.
- Fong, G. H., J. Klingensmith, et al. (1996). "Regulation of flt-1 expression during mouse embryogenesis suggests a role in the establishment of vascular endothelium." Dev Dyn **207**(1): 1-10.
- Fong, G. H., J. Rossant, et al. (1995). "Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium." Nature **376**(6535): 66-70.
- Forstreuter, F., R. Lucius, et al. (2002). "Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells." J Neuroimmunol **132**(1-2): 93-98.
- Foster, K. A., N. McLaughlin, et al. (2010). "Distinct roles of NR2A and NR2B cytoplasmic tails in long-term potentiation." J Neurosci **30**(7): 2676-2685.
- Fournier, N. M. and R. S. Duman (2012). "Role of vascular endothelial growth factor in adult hippocampal neurogenesis: implications for the pathophysiology and treatment of depression." Behav Brain Res **227**(2): 440-449.
- Fournier, N. M., B. Lee, et al. (2012). "Vascular endothelial growth factor regulates adult hippocampal cell proliferation through MEK/ERK- and PI3K/Akt-dependent signaling." Neuropharmacology **63**(4): 642-652.
- Fox, C. J., K. I. Russell, et al. (2006). "Contribution of NR2A and NR2B NMDA subunits to bidirectional synaptic plasticity in the hippocampus in vivo." Hippocampus **16**(11): 907-915.
- Freitas-Andrade, M., P. Carmeliet, et al. (2008). "VEGFR-2-mediated increased proliferation and survival in response to oxygen and glucose deprivation in PIGF knockout astrocytes." J Neurochem **107**(3): 756-767.
- Fukazawa, Y., Y. Saitoh, et al. (2003). "Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo." Neuron **38**(3): 447-460.
- Fulzele, S. and A. Pillai (2009). "Decreased VEGF mRNA expression in the dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenia subjects." Schizophr Res **115**(2-3): 372-373.
- Galecki, P., E. Galecka, et al. (2013). "Vascular endothelial growth factor gene (VEGFA) polymorphisms may serve as prognostic factors for recurrent depressive disorder development." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **45**: 117-124.
- Galecki, P., A. Orzechowska, et al. (2013). "Vascular endothelial growth factor receptor 2 gene (KDR) polymorphisms and expression levels in depressive disorder." J Affect Disord **147**(1-3): 144-149.

- Gambrill, A. C. and A. Barria (2011). "NMDA receptor subunit composition controls synaptogenesis and synapse stabilization." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(14): 5855-5860.
- Ganguly, K., L. Kiss, et al. (2000). "Enhancement of presynaptic neuronal excitability by correlated presynaptic and postsynaptic spiking." Nat Neurosci **3**(10): 1018-1026.
- Gardoni, F., D. Mauceri, et al. (2009). "Decreased NR2B subunit synaptic levels cause impaired long-term potentiation but not long-term depression." J Neurosci **29**(3): 669-677.
- Gardoni, F., F. Polli, et al. (2006). "Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation modulates PSD-95 binding to NMDA receptors." Eur J Neurosci **24**(10): 2694-2704.
- Gartner, A., D. G. Polnau, et al. (2006). "Hippocampal long-term potentiation is supported by presynaptic and postsynaptic tyrosine receptor kinase B-mediated phospholipase Cgamma signaling." J Neurosci **26**(13): 3496-3504.
- Ge, Y., Z. Dong, et al. (2010). "Hippocampal long-term depression is required for the consolidation of spatial memory." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(38): 16697-16702.
- Geinisman, Y. (2000). "Structural synaptic modifications associated with hippocampal LTP and behavioral learning." Cereb Cortex **10**(10): 952-962.
- Gerber, H. P., A. McMurtrey, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation." J Biol Chem **273**(46): 30336-30343.
- Geretti, E., A. Shimizu, et al. (2008). "Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis." Angiogenesis **11**(1): 31-39.
- Gerhardt, H., M. Golding, et al. (2003). "VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia." J Cell Biol **161**(6): 1163-1177.
- Gielen, M., B. Siegler Retchless, et al. (2009). "Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits." Nature **459**(7247): 703-707.
- Giese, K. P., N. B. Fedorov, et al. (1998). "Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning." Science **279**(5352): 870-873.
- Goebel-Goody, S. M., K. D. Davies, et al. (2009). "Phospho-regulation of synaptic and extrasynaptic N-methyl-d-aspartate receptors in adult hippocampal slices." Neuroscience **158**(4): 1446-1459.
- Gourlaouen, M., J. C. Welte, et al. (2013). "Essential role for endocytosis in the growth factor-stimulated activation of ERK1/2 in endothelial cells." J Biol Chem **288**(11): 7467-7480.
- Grant, S. G., T. J. O'Dell, et al. (1992). "Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice." Science **258**(5090): 1903-1910.
- Grey, K. B. and B. D. Burrell (2010). "Co-induction of LTP and LTD and its regulation by protein kinases and phosphatases." J Neurophysiol **103**(5): 2737-2746.
- Griffith, L. C. (1997). "Drosophila melanogaster as a model system for the study of the function of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in synaptic plasticity." Invert Neurosci **3**(2-3): 93-102.
- Groc, L., D. Choquet, et al. (2007). "NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein Reelin." J Neurosci **27**(38): 10165-10175.
- Groc, L., M. Heine, et al. (2006). "NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(49): 18769-18774.

- Gu, C., Y. Yoshida, et al. (2005). "Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins." *Science* **307**(5707): 265-268.
- Guo, Y., D. Shi, et al. (2010). "Effects of cerebral microvascular endothelial cells and vascular endothelial growth factor on the proliferation and differentiation of NSCs: a comparative study." *Br J Neurosurg* **24**(1): 62-68.
- Haigh, J. J., P. I. Morelli, et al. (2003). "Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling." *Dev Biol* **262**(2): 225-241.
- Harris, A. Z. and D. L. Pettit (2007). "Extrasynaptic and synaptic NMDA receptors form stable and uniform pools in rat hippocampal slices." *J Physiol* **584**(Pt 2): 509-519.
- Harsch, A. and H. P. Robinson (2000). "Postsynaptic variability of firing in rat cortical neurons: the roles of input synchronization and synaptic NMDA receptor conductance." *J Neurosci* **20**(16): 6181-6192.
- Hawkins, L. M., K. Prybylowski, et al. (2004). "Export from the endoplasmic reticulum of assembled N-methyl-D-aspartic acid receptors is controlled by a motif in the c terminus of the NR2 subunit." *J Biol Chem* **279**(28): 28903-28910.
- Hayashi, Y., S. H. Shi, et al. (2000). "Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction." *Science* **287**(5461): 2262-2267.
- Herbert, S. P., J. Huisken, et al. (2009). "Arterial-venous segregation by selective cell sprouting: an alternative mode of blood vessel formation." *Science* **326**(5950): 294-298.
- Hiesberger, T., M. Trommsdorff, et al. (1999). "Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation." *Neuron* **24**(2): 481-489.
- Hill, T. C. and K. Zito (2013). "LTP-induced long-term stabilization of individual nascent dendritic spines." *J Neurosci* **33**(2): 678-686.
- Hisatsune, C., H. Umemori, et al. (1997). "Phosphorylation-dependent regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by calmodulin." *J Biol Chem* **272**(33): 20805-20810.
- Hoey, S. E., R. J. Williams, et al. (2009). "Synaptic NMDA receptor activation stimulates alpha-secretase amyloid precursor protein processing and inhibits amyloid-beta production." *J Neurosci* **29**(14): 4442-4460.
- Holbro, N., A. Grunditz, et al. (2009). "Differential distribution of endoplasmic reticulum controls metabotropic signaling and plasticity at hippocampal synapses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(35): 15055-15060.
- Holmes, D. I. and I. Zachary (2005). "The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease." *Genome Biol* **6**(2): 209.
- Horak, M., K. Chang, et al. (2008). "Masking of the endoplasmic reticulum retention signals during assembly of the NMDA receptor." *J Neurosci* **28**(13): 3500-3509.
- Horak, M. and R. J. Wenthold (2009). "Different roles of C-terminal cassettes in the trafficking of full-length NR1 subunits to the cell surface." *J Biol Chem* **284**(15): 9683-9691.
- Hrabetova, S. and T. C. Sacktor (1996). "Bidirectional regulation of protein kinase M zeta in the maintenance of long-term potentiation and long-term depression." *J Neurosci* **16**(17): 5324-5333.
- Hrabetova, S., P. Serrano, et al. (2000). "Distinct NMDA receptor subpopulations contribute to long-term potentiation and long-term depression induction." *J Neurosci* **20**(12): RC81.
- Hruska, M. and M. B. Dalva (2012). "Ephrin regulation of synapse formation, function and plasticity." *Mol Cell Neurosci* **50**(1): 35-44.
- Hu, G. Y., O. Hvalby, et al. (1987). "Protein kinase C injection into hippocampal pyramidal cells elicits features of long term potentiation." *Nature* **328**(6129): 426-429.



- Huang, K., C. Andersson, et al. (2001). "Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers." Int J Biochem Cell Biol **33**(4): 315-324.
- Huang, Y. F., C. H. Yang, et al. (2010). "Pharmacological and genetic accumulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  enhances excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons through the production of vascular endothelial growth factor." J Neurosci **30**(17): 6080-6093.
- Huang, Y. Y. and E. R. Kandel (2007). "5-Hydroxytryptamine induces a protein kinase A/mitogen-activated protein kinase-mediated and macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation in the amygdala." J Neurosci **27**(12): 3111-3119.
- Huang, Y. Y. and E. R. Kandel (2007). "Low-frequency stimulation induces a pathway-specific late phase of LTP in the amygdala that is mediated by PKA and dependent on protein synthesis." Learn Mem **14**(7): 497-503.
- Hutchings, H., N. Ortega, et al. (2003). "Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation." FASEB J **17**(11): 1520-1522.
- Iafrati, J., M. J. Orejarena, et al. (2013). "Reelin, an extracellular matrix protein linked to early onset psychiatric diseases, drives postnatal development of the prefrontal cortex via GluN2B-NMDARs and the mTOR pathway." Mol Psychiatry.
- Ichtchenko, K., Y. Hata, et al. (1995). "Neurologin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins." Cell **81**(3): 435-443.
- Ikeda, S., M. Ushio-Fukai, et al. (2005). "Novel role of ARF6 in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis." Circ Res **96**(4): 467-475.
- Impey, S., K. Obrietan, et al. (1998). "Cross talk between ERK and PKA is required for Ca<sup>2+</sup> stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation." Neuron **21**(4): 869-883.
- Irie, M., Y. Hata, et al. (1997). "Binding of neuroligins to PSD-95." Science **277**(5331): 1511-1515.
- Isaac, J. T., R. A. Nicoll, et al. (1995). "Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP." Neuron **15**(2): 427-434.
- Ishida, A., T. Kitani, et al. (1994). "Inactivation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin." J Biochem **115**(6): 1075-1082.
- Ito, I., H. Hidaka, et al. (1991). "Effects of KN-62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, on long-term potentiation in the rat hippocampus." Neurosci Lett **121**(1-2): 119-121.
- Izumi, Y., D. B. Clifford, et al. (1990). "Glycine antagonists block the induction of long-term potentiation in CA1 of rat hippocampal slices." Neurosci Lett **112**(2-3): 251-256.
- Izumi, Y., D. B. Clifford, et al. (1992). "Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release." Science **257**(5074): 1273-1276.
- Jakeman, L. B., M. Armanini, et al. (1993). "Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis." Endocrinology **133**(2): 848-859.
- Jakobsson, L., J. Kreuger, et al. (2006). "Heparan sulfate in trans potentiates VEGFR-mediated angiogenesis." Dev Cell **10**(5): 625-634.
- Jekely, G., H. H. Sung, et al. (2005). "Regulators of endocytosis maintain localized receptor tyrosine kinase signaling in guided migration." Dev Cell **9**(2): 197-207.

- Jeltsch, M., A. Kaipainen, et al. (1997). "Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice." Science **276**(5317): 1423-1425.
- Jeltsch, M., V. M. Leppanen, et al. (2013). "Receptor tyrosine kinase-mediated angiogenesis." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(9).
- Jin, F., N. Hagemann, et al. (2013). "LDL attenuates VEGF-induced angiogenesis via mechanisms involving VEGFR2 internalization and degradation following endosome-trans-Golgi network trafficking." Angiogenesis **16**(3): 625-637.
- Jin, K., X. O. Mao, et al. (2001). "Caspase-3 and the regulation of hypoxic neuronal death by vascular endothelial growth factor." Neuroscience **108**(2): 351-358.
- Jin, K., X. O. Mao, et al. (2006). "Vascular endothelial growth factor stimulates neurite outgrowth from cerebral cortical neurons via Rho kinase signaling." J Neurobiol **66**(3): 236-242.
- Jin, K., Y. Zhu, et al. (2002). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11946-11950.
- Jin, K. L., X. O. Mao, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(18): 10242-10247.
- Jones, E. A., L. Yuan, et al. (2008). "Separating genetic and hemodynamic defects in neuropilin 1 knockout embryos." Development **135**(14): 2479-2488.
- Jopling, H. M., A. F. Odell, et al. (2009). "Rab GTPase regulation of VEGFR2 trafficking and signaling in endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(7): 1119-1124.
- Jourdain, P., K. Fukunaga, et al. (2003). "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to activity-dependent filopodia growth and spine formation." J Neurosci **23**(33): 10645-10649.
- Kameyama, K., H. K. Lee, et al. (1998). "Involvement of a postsynaptic protein kinase A substrate in the expression of homosynaptic long-term depression." Neuron **21**(5): 1163-1175.
- Kauderer, B. S. and E. R. Kandel (2000). "Capture of a protein synthesis-dependent component of long-term depression." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(24): 13342-13347.
- Kauer, J. A., R. C. Malenka, et al. (1988). "NMDA application potentiates synaptic transmission in the hippocampus." Nature **334**(6179): 250-252.
- Kawasaki, T., T. Kitsukawa, et al. (1999). "A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation." Development **126**(21): 4895-4902.
- Kelly, M. T., J. F. Cray, et al. (2007). "Regulation of protein kinase Mzeta synthesis by multiple kinases in long-term potentiation." J Neurosci **27**(13): 3439-3444.
- Kemp, A., W. Tischmeyer, et al. (2013). "Learning-facilitated long-term depression requires activation of the immediate early gene, c-fos, and is transcription dependent." Behav Brain Res **254**: 83-91.
- Kerchner, G. A. and R. A. Nicoll (2008). "Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP." Nat Rev Neurosci **9**(11): 813-825.
- Kessels, H. W. and R. Malinow (2009). "Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior." Neuron **61**(3): 340-350.
- Khaibullina, A. A., J. M. Rosenstein, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor promotes neurite maturation in primary CNS neuronal cultures." Brain Res Dev Brain Res **148**(1): 59-68.
- Kiger, A. A., B. Baum, et al. (2003). "A functional genomic analysis of cell morphology using RNA interference." J Biol **2**(4): 27.

- Kim, B. W., M. Choi, et al. (2008). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling regulates hippocampal neurons by elevation of intracellular calcium and activation of calcium/calmodulin protein kinase II and mammalian target of rapamycin." Cell Signal **20**(4): 714-725.
- Kim, H. Y., J. S. Choi, et al. (2007). "Expression of vascular endothelial growth factor receptors Flt-1 and Flk-1 in embryonic rat forebrain." Neurosci Lett **425**(2): 131-135.
- Kim, I., Y. S. Ryu, et al. (2002). "EphB ligand, ephrinB2, suppresses the VEGF- and angiopoietin 1-induced Ras/mitogen-activated protein kinase pathway in venous endothelial cells." FASEB J **16**(9): 1126-1128.
- Kim, M. J., K. Futai, et al. (2007). "Synaptic accumulation of PSD-95 and synaptic function regulated by phosphorylation of serine-295 of PSD-95." Neuron **56**(3): 488-502.
- Kim, S. J. and D. J. Linden (2007). "Ubiquitous plasticity and memory storage." Neuron **56**(4): 582-592.
- Kirby, M. L., T. F. Gale, et al. (1983). "Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation." Science **220**(4601): 1059-1061.
- Kirkwood, A. and M. F. Bear (1994). "Homosynaptic long-term depression in the visual cortex." J Neurosci **14**(5 Pt 2): 3404-3412.
- Kiuchi, T., H. Lee, et al. (2012). "Regular exercise cures depression-like behavior via VEGF-Flk-1 signaling in chronically stressed mice." Neuroscience **207**: 208-217.
- Klein, R. (2009). "Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/ephrin signaling." Nat Neurosci **12**(1): 15-20.
- Klein, R. (2012). "Eph/ephrin signalling during development." Development **139**(22): 4105-4109.
- Ko, J., S. Kim, et al. (2006). "SALM synaptic cell adhesion-like molecules regulate the differentiation of excitatory synapses." Neuron **50**(2): 233-245.
- Ko, J., C. Zhang, et al. (2009). "Neurologin-1 performs neuroligin-dependent and neuroligin-independent functions in synapse validation." EMBO J **28**(20): 3244-3255.
- Koch, A. W., T. Mathivet, et al. (2011). "Robo4 maintains vessel integrity and inhibits angiogenesis by interacting with UNC5B." Dev Cell **20**(1): 33-46.
- Koch, S., S. Tugues, et al. (2011). "Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors." Biochem J **437**(2): 169-183.
- Kohr, G. (2006). "NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution." Cell Tissue Res **326**(2): 439-446.
- Kolodkin, A. L., D. J. Matthes, et al. (1993). "The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules." Cell **75**(7): 1389-1399.
- Kornau, H. C., L. T. Schenker, et al. (1995). "Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95." Science **269**(5231): 1737-1740.
- Korte, M., P. Carroll, et al. (1995). "Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(19): 8856-8860.
- Korte, M., O. Griesbeck, et al. (1996). "Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12547-12552.
- Kranich, S., K. Hattermann, et al. (2009). "VEGFR-3/Flt-4 mediates proliferation and chemotaxis in glial precursor cells." Neurochem Int **55**(8): 747-753.

- Kristiansen, L. V., B. Bakir, et al. (2010). "Expression of the NR2B-NMDA receptor trafficking complex in prefrontal cortex from a group of elderly patients with schizophrenia." *Schizophr Res* **119**(1-3): 198-209.
- Krueger, D. D., L. P. Tuffy, et al. (2012). "The role of neurexins and neuroligins in the formation, maturation, and function of vertebrate synapses." *Curr Opin Neurobiol* **22**(3): 412-422.
- Kullmann, D. M. and R. A. Nicoll (1992). "Long-term potentiation is associated with increases in quantal content and quantal amplitude." *Nature* **357**(6375): 240-244.
- Lai Wing Sun, K., J. P. Correia, et al. (2011). "Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions." *Development* **138**(11): 2153-2169.
- Lampugnani, M. G., F. Orsenigo, et al. (2006). "Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments." *J Cell Biol* **174**(4): 593-604.
- Lan, J. Y., V. A. Skeberdis, et al. (2001). "Protein kinase C modulates NMDA receptor trafficking and gating." *Nat Neurosci* **4**(4): 382-390.
- Lanahan, A., X. Zhang, et al. (2013). "The neuropilin 1 cytoplasmic domain is required for VEGF-A-dependent arteriogenesis." *Dev Cell* **25**(2): 156-168.
- Lanahan, A. A., K. Hermans, et al. (2010). "VEGF receptor 2 endocytic trafficking regulates arterial morphogenesis." *Dev Cell* **18**(5): 713-724.
- Larrivee, B., C. Freitas, et al. (2007). "Activation of the UNC5B receptor by Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis." *Genes Dev* **21**(19): 2433-2447.
- Lau, C. G. and R. S. Zukin (2007). "NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders." *Nat Rev Neurosci* **8**(6): 413-426.
- Lavezzari, G., J. McCallum, et al. (2004). "Subunit-specific regulation of NMDA receptor endocytosis." *J Neurosci* **24**(28): 6383-6391.
- Le Jan, S., M. Hayashi, et al. (2012). "Functional overlap between chondroitin and heparan sulfate proteoglycans during VEGF-induced sprouting angiogenesis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**(5): 1255-1263.
- Learte, A. R., M. G. Forero, et al. (2008). "Gliatrophic and gliatropic roles of PVF/PVR signaling during axon guidance." *Glia* **56**(2): 164-176.
- Lee, H. K., K. Kameyama, et al. (1998). "NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus." *Neuron* **21**(5): 1151-1162.
- Lee, J. S., D. J. Jang, et al. (2009). "Induction of neuronal vascular endothelial growth factor expression by cAMP in the dentate gyrus of the hippocampus is required for antidepressant-like behaviors." *J Neurosci* **29**(26): 8493-8505.
- Lee, S. J., Y. Escobedo-Lozoya, et al. (2009). "Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation." *Nature* **458**(7236): 299-304.
- Lemieux, M., S. Labrecque, et al. (2012). "Translocation of CaMKII to dendritic microtubules supports the plasticity of local synapses." *J Cell Biol* **198**(6): 1055-1073.
- Lengyel, I., K. Voss, et al. (2004). "Autonomous activity of CaMKII is only transiently increased following the induction of long-term potentiation in the rat hippocampus." *Eur J Neurosci* **20**(11): 3063-3072.
- Leung, D. W., G. Cachianes, et al. (1989). "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen." *Science* **246**(4935): 1306-1309.
- Leventhal, C., S. Rafii, et al. (1999). "Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma." *Mol Cell Neurosci* **13**(6): 450-464.

- Li, B., W. Xu, et al. (2003). "VEGF-induced activation of the PI3-K/Akt pathway reduces mutant SOD1-mediated motor neuron cell death." Brain Res Mol Brain Res **111**(1-2): 155-164.
- Li, Y., Y. Mu, et al. (2009). "Development of neural circuits in the adult hippocampus." Curr Top Dev Biol **87**: 149-174.
- Liao, D., A. Jones, et al. (1992). "Direct measurement of quantal changes underlying long-term potentiation in CA1 hippocampus." Neuron **9**(6): 1089-1097.
- Licht, T., I. Goshen, et al. (2011). "Reversible modulations of neuronal plasticity by VEGF." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(12): 5081-5086.
- Licht, T. and E. Keshet (2013). "Delineating multiple functions of VEGF-A in the adult brain." Cell Mol Life Sci **70**(10): 1727-1737.
- Lin, B., E. A. Kramar, et al. (2005). "Theta stimulation polymerizes actin in dendritic spines of hippocampus." J Neurosci **25**(8): 2062-2069.
- Lin, D. T., Y. Makino, et al. (2009). "Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation." Nat Neurosci **12**(7): 879-887.
- Lin, E. I., O. Jeyifous, et al. (2013). "CASK regulates SAP97 conformation and its interactions with AMPA and NMDA receptors." J Neurosci **33**(29): 12067-12076.
- Liou, Y. J., Y. C. Wang, et al. (2007). "Association analysis of polymorphisms in the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit 2B (GRIN2B) gene and tardive dyskinesia in schizophrenia." Psychiatry Res **153**(3): 271-275.
- Lisman, J., R. Yasuda, et al. (2012). "Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation." Nat Rev Neurosci **13**(3): 169-182.
- Liu, L., T. P. Wong, et al. (2004). "Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity." Science **304**(5673): 1021-1024.
- Liu, S. Y., F. F. Zeng, et al. (2013). "Vascular endothelial growth factor gene promoter polymorphisms and Alzheimer's disease risk: a meta-analysis." CNS Neurosci Ther **19**(7): 469-476.
- Liu, X. B., K. D. Murray, et al. (2004). "Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development." J Neurosci **24**(40): 8885-8895.
- Lledo, P. M., G. O. Hjelmstad, et al. (1995). "Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 11175-11179.
- Lovinger, D. M. and A. Routtenberg (1988). "Synapse-specific protein kinase C activation enhances maintenance of long-term potentiation in rat hippocampus." J Physiol **400**: 321-333.
- Lovinger, D. M., K. L. Wong, et al. (1987). "Protein kinase C inhibitors eliminate hippocampal long-term potentiation." Brain Res **436**(1): 177-183.
- Lu, W., K. Isozaki, et al. (2010). "Synaptic targeting of AMPA receptors is regulated by a CaMKII site in the first intracellular loop of GluA1." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(51): 22266-22271.
- Lu, Y. M., Z. Jia, et al. (1997). "Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP." J Neurosci **17**(13): 5196-5205.
- Lu, Y. M., J. C. Roder, et al. (1998). "Src activation in the induction of long-term potentiation in CA1 hippocampal neurons." Science **279**(5355): 1363-1367.
- Luo, Y., D. Raible, et al. (1993). "Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones." Cell **75**(2): 217-227.



- Luscher, C. and K. M. Huber (2010). "Group 1 mGluR-dependent synaptic long-term depression: mechanisms and implications for circuitry and disease." Neuron **65**(4): 445-459.
- Luscher, C. and R. C. Malenka (2012). "NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD)." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(6).
- Lynch, G., J. Larson, et al. (1983). "Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation." Nature **305**(5936): 719-721.
- Lynch, M. A. (2004). "Long-term potentiation and memory." Physiol Rev **84**(1): 87-136.
- Ma, Y. Y., K. Y. Li, et al. (2009). "Vascular endothelial growth factor acutely reduces calcium influx via inhibition of the Ca<sup>2+</sup> channels in rat hippocampal neurons." J Neurosci Res **87**(2): 393-402.
- Mac Gabhann, F. and A. S. Popel (2007). "Dimerization of VEGF receptors and implications for signal transduction: a computational study." Biophys Chem **128**(2-3): 125-139.
- Maharaj, A. S., M. Saint-Geniez, et al. (2006). "Vascular endothelial growth factor localization in the adult." Am J Pathol **168**(2): 639-648.
- Makinen, T., R. H. Adams, et al. (2005). "PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature." Genes Dev **19**(3): 397-410.
- Makino, H. and R. Malinow (2009). "AMPA receptor incorporation into synapses during LTP: the role of lateral movement and exocytosis." Neuron **64**(3): 381-390.
- Malenka, R. C. and M. F. Bear (2004). "LTP and LTD: an embarrassment of riches." Neuron **44**(1): 5-21.
- Malenka, R. C., J. A. Kauer, et al. (1988). "Postsynaptic calcium is sufficient for potentiation of hippocampal synaptic transmission." Science **242**(4875): 81-84.
- Malinow, R. (2012). "New developments on the role of NMDA receptors in Alzheimer's disease." Curr Opin Neurobiol **22**(3): 559-563.
- Malinow, R., D. V. Madison, et al. (1988). "Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation." Nature **335**(6193): 820-824.
- Malinow, R. and R. C. Malenka (2002). "AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity." Annu Rev Neurosci **25**: 103-126.
- Malinow, R. and J. P. Miller (1986). "Postsynaptic hyperpolarization during conditioning reversibly blocks induction of long-term potentiation." Nature **320**(6062): 529-530.
- Malinow, R., H. Schulman, et al. (1989). "Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP." Science **245**(4920): 862-866.
- Malinow, R. and R. W. Tsien (1990). "Presynaptic enhancement shown by whole-cell recordings of long-term potentiation in hippocampal slices." Nature **346**(6280): 177-180.
- Man, H. Y., J. W. Lin, et al. (2000). "Regulation of AMPA receptor-mediated synaptic transmission by clathrin-dependent receptor internalization." Neuron **25**(3): 649-662.
- Manitt, C., A. M. Nikolakopoulou, et al. (2009). "Netrin participates in the development of retinotectal synaptic connectivity by modulating axon arborization and synapse formation in the developing brain." J Neurosci **29**(36): 11065-11077.
- Martiny-Baron, G., P. Holzer, et al. (2010). "The small molecule specific EphB4 kinase inhibitor NVP-BHG712 inhibits VEGF driven angiogenesis." Angiogenesis **13**(3): 259-267.
- Massey, P. V. and Z. I. Bashir (2007). "Long-term depression: multiple forms and implications for brain function." Trends Neurosci **30**(4): 176-184.

- Massey, P. V., B. E. Johnson, et al. (2004). "Differential roles of NR2A and NR2B-containing NMDA receptors in cortical long-term potentiation and long-term depression." J Neurosci **24**(36): 7821-7828.
- Matsumoto, T., S. Bohman, et al. (2005). "VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis." EMBO J **24**(13): 2342-2353.
- Matthies, H. and K. G. Reymann (1993). "Protein kinase A inhibitors prevent the maintenance of hippocampal long-term potentiation." Neuroreport **4**(6): 712-714.
- Matthies, H., H. Schroder, et al. (1995). "NMDA/R1-antisense oligonucleotide influences the early stage of long-term potentiation in the CA1-region of rat hippocampus." Neurosci Lett **202**(1-2): 113-116.
- Mattila, E., K. Auvinen, et al. (2008). "The protein tyrosine phosphatase TCPTP controls VEGFR2 signalling." J Cell Sci **121**(Pt 21): 3570-3580.
- Maurer, M. H., W. K. Tripps, et al. (2003). "Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rat neural stem cells." Neurosci Lett **344**(3): 165-168.
- McAllister, A. K. (2007). "Dynamic aspects of CNS synapse formation." Annu Rev Neurosci **30**: 425-450.
- McCloskey, D. P., S. D. Croll, et al. (2005). "Depression of synaptic transmission by vascular endothelial growth factor in adult rat hippocampus and evidence for increased efficacy after chronic seizures." J Neurosci **25**(39): 8889-8897.
- McCloskey, D. P., T. M. Hintz, et al. (2008). "Modulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in motor neurons and its electrophysiological effects." Brain Res Bull **76**(1-2): 36-44.
- McKinney, R. A. (2010). "Excitatory amino acid involvement in dendritic spine formation, maintenance and remodelling." J Physiol **588**(Pt 1): 107-116.
- Meissirel, C., C. Ruiz de Almodovar, et al. (2011). "VEGF modulates NMDA receptors activity in cerebellar granule cells through Src-family kinases before synapse formation." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(33): 13782-13787.
- Meng, Y., Y. Zhang, et al. (2003). "Synaptic transmission and plasticity in the absence of AMPA glutamate receptor GluR2 and GluR3." Neuron **39**(1): 163-176.
- Menna, E., S. Zambetti, et al. (2013). "Eps8 controls dendritic spine density and synaptic plasticity through its actin-capping activity." EMBO J **32**(12): 1730-1744.
- Messersmith, E. K., E. D. Leonardo, et al. (1995). "Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord." Neuron **14**(5): 949-959.
- Millauer, B., S. Wizigmann-Voos, et al. (1993). "High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis." Cell **72**(6): 835-846.
- Mimura, T., S. Amano, et al. (2001). "Expression of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in corneal lymphangiogenesis." Exp Eye Res **72**(1): 71-78.
- Miyashita, T., Y. Oda, et al. (2012). "Mg(2+) block of Drosophila NMDA receptors is required for long-term memory formation and CREB-dependent gene expression." Neuron **74**(5): 887-898.
- Mony, L., L. Krzaczkowski, et al. (2009). "Structural basis of NR2B-selective antagonist recognition by N-methyl-D-aspartate receptors." Mol Pharmacol **75**(1): 60-74.
- Monyer, H., N. Burnashev, et al. (1994). "Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors." Neuron **12**(3): 529-540.

- Morris, R. G., E. Anderson, et al. (1986). "Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5." Nature **319**(6056): 774-776.
- Mott, D. D. and D. V. Lewis (1991). "Facilitation of the induction of long-term potentiation by GABAB receptors." Science **252**(5013): 1718-1720.
- Mulkey, R. M., S. Endo, et al. (1994). "Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression." Nature **369**(6480): 486-488.
- Mulkey, R. M., C. E. Herron, et al. (1993). "An essential role for protein phosphatases in hippocampal long-term depression." Science **261**(5124): 1051-1055.
- Nam, J. O., H. N. Son, et al. (2012). "FAS1 domain protein inhibits VEGF165-induced angiogenesis by targeting the interaction between VEGFR-2 and alphavbeta3 integrin." Mol Cancer Res **10**(8): 1010-1020.
- Navon, H., Y. Bromberg, et al. (2012). "Neuroprotection by NMDA preconditioning against glutamate cytotoxicity is mediated through activation of ERK 1/2, inactivation of JNK, and by prevention of glutamate-induced CREB inactivation." J Mol Neurosci **46**(1): 100-108.
- Nayak, A., D. J. Zastrow, et al. (1998). "Maintenance of late-phase LTP is accompanied by PKA-dependent increase in AMPA receptor synthesis." Nature **394**(6694): 680-683.
- Nayak, A. S., C. I. Moore, et al. (1996). "Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of the presynaptic protein synapsin I is persistently increased during long-term potentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15451-15456.
- Neagoe, P. E., C. Lemieux, et al. (2005). "Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor-1 and -2 heterodimer." J Biol Chem **280**(11): 9904-9912.
- Neufeld, G., T. Cohen, et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors." FASEB J **13**(1): 9-22.
- Neufeld, G., O. Kessler, et al. (2002). "The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF." Adv Exp Med Biol **515**: 81-90.
- Neyton, J. and P. Paoletti (2006). "Relating NMDA receptor function to receptor subunit composition: limitations of the pharmacological approach." J Neurosci **26**(5): 1331-1333.
- Nicoletti, J. N., S. K. Shah, et al. (2008). "Vascular endothelial growth factor is up-regulated after status epilepticus and protects against seizure-induced neuronal loss in hippocampus." Neuroscience **151**(1): 232-241.
- Nikitidou, L., I. Kanter-Schlifke, et al. (2012). "VEGF receptor-2 (Flk-1) overexpression in mice counteracts focal epileptic seizures." PLoS One **7**(7): e40535.
- Nikonenko, I., B. Boda, et al. (2008). "PSD-95 promotes synaptogenesis and multiinnervated spine formation through nitric oxide signaling." J Cell Biol **183**(6): 1115-1127.
- Nong, Y., Y. Q. Huang, et al. (2003). "Glycine binding primes NMDA receptor internalization." Nature **422**(6929): 302-307.
- Nong, Y., Y. Q. Huang, et al. (2004). "NMDA receptors are movin' in." Curr Opin Neurobiol **14**(3): 353-361.
- Normann, C., D. Peckys, et al. (2000). "Associative long-term depression in the hippocampus is dependent on postsynaptic N-type Ca<sup>2+</sup> channels." J Neurosci **20**(22): 8290-8297.
- O'Brien, R., D. Xu, et al. (2002). "Synaptically targeted narp plays an essential role in the aggregation of AMPA receptors at excitatory synapses in cultured spinal neurons." J Neurosci **22**(11): 4487-4498.



- Oh, M. C., V. A. Derkach, et al. (2006). "Extrasynaptic membrane trafficking regulated by GluR1 serine 845 phosphorylation primes AMPA receptors for long-term potentiation." J Biol Chem **281**(2): 752-758.
- Oliet, S. H., R. C. Malenka, et al. (1997). "Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells." Neuron **18**(6): 969-982.
- Oliver, M. W., J. Larson, et al. (1990). "Activation of the glycine site associated with the NMDA receptor is required for induction of LTP in neonatal hippocampus." Int J Dev Neurosci **8**(4): 417-424.
- Olofsson, B. and D. T. Page (2005). "Condensation of the central nervous system in embryonic *Drosophila* is inhibited by blocking hemocyte migration or neural activity." Dev Biol **279**(1): 233-243.
- Olsson, A. K., A. Dimberg, et al. (2006). "VEGF receptor signalling - in control of vascular function." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(5): 359-371.
- Oosthuysen, B., L. Moons, et al. (2001). "Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration." Nat Genet **28**(2): 131-138.
- Orecchia, A., P. M. Lacal, et al. (2003). "Vascular endothelial growth factor receptor-1 is deposited in the extracellular matrix by endothelial cells and is a ligand for the alpha 5 beta 1 integrin." J Cell Sci **116**(Pt 17): 3479-3489.
- Ostroff, L. E., J. C. Fiala, et al. (2002). "Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices." Neuron **35**(3): 535-545.
- Otmakhova, N. A., N. Otmakhov, et al. (2000). "Inhibition of the cAMP pathway decreases early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses." J Neurosci **20**(12): 4446-4451.
- Paavonen, K., P. Puolakkainen, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing." Am J Pathol **156**(5): 1499-1504.
- Palmer, T. D., A. R. Willhoite, et al. (2000). "Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis." J Comp Neurol **425**(4): 479-494.
- Paoletti, P., C. Bellone, et al. (2013). "NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease." Nat Rev Neurosci **14**(6): 383-400.
- Paoletti, P. and J. Neyton (2007). "NMDA receptor subunits: function and pharmacology." Curr Opin Pharmacol **7**(1): 39-47.
- Papouin, T., L. Ladepeche, et al. (2012). "Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists." Cell **150**(3): 633-646.
- Paratcha, G., M. Furman, et al. (2000). "Involvement of hippocampal PKC $\beta$  isoform in the early phase of memory formation of an inhibitory avoidance learning." Brain Res **855**(2): 199-205.
- Park, S. Y., X. Shi, et al. (2013). "Thioredoxin-interacting protein mediates sustained VEGFR2 signaling in endothelial cells required for angiogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(4): 737-743.
- Pasquale, E. B. (2008). "Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease." Cell **133**(1): 38-52.
- Pati, S., S. A. Orsi, et al. (2009). "Intra-hippocampal administration of the VEGF receptor blocker PTK787/ZK222584 impairs long-term memory." Brain Res **1256**: 85-91.
- Patterson, S. L., T. Abel, et al. (1996). "Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice." Neuron **16**(6): 1137-1145.

- Pavlovsky, A., A. Gianfelice, et al. (2010). "A postsynaptic signaling pathway that may account for the cognitive defect due to IL1RAPL1 mutation." Curr Biol **20**(2): 103-115.
- Pellet-Many, C., P. Frankel, et al. (2008). "Neuropilins: structure, function and role in disease." Biochem J **411**(2): 211-226.
- Perez-Otano, I. and M. D. Ehlers (2004). "Learning from NMDA receptor trafficking: clues to the development and maturation of glutamatergic synapses." Neurosignals **13**(4): 175-189.
- Petralia, R. S., R. A. Al-Hallaq, et al. (2009). "Trafficking and Targeting of NMDA Receptors." Pettit, D. L., S. Perlman, et al. (1994). "Potentiated transmission and prevention of further LTP by increased CaMKII activity in postsynaptic hippocampal slice neurons." Science **266**(5192): 1881-1885.
- Pi, H. J., N. Otmakhov, et al. (2010). "Autonomous CaMKII can promote either long-term potentiation or long-term depression, depending on the state of T305/T306 phosphorylation." J Neurosci **30**(26): 8704-8709.
- Pimentel-Coelho, P. M. and S. Rivest (2012). "The early contribution of cerebrovascular factors to the pathogenesis of Alzheimer's disease." Eur J Neurosci **35**(12): 1917-1937.
- Pocock, T. M., R. R. Foster, et al. (2004). "Evidence of a role for TRPC channels in VEGF-mediated increased vascular permeability in vivo." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(3): H1015-1026.
- Prahst, C., M. Herault, et al. (2008). "Neuropilin-1-VEGFR-2 complexing requires the PDZ-binding domain of neuropilin-1." J Biol Chem **283**(37): 25110-25114.
- Prybylowski, K., K. Chang, et al. (2005). "The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2." Neuron **47**(6): 845-857.
- Prybylowski, K. and R. J. Wenthold (2004). "N-Methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse." J Biol Chem **279**(11): 9673-9676.
- Qi, J. H. and L. Claesson-Welsh (2001). "VEGF-induced activation of phosphoinositide 3-kinase is dependent on focal adhesion kinase." Exp Cell Res **263**(1): 173-182.
- Qin, H. and J. Dubnau (2010). "Genetic disruptions of Drosophila Pavlovian learning leave extinction learning intact." Genes Brain Behav **9**(2): 203-212.
- Qiu, M. H., R. Zhang, et al. (2003). "Enhancement of ischemia-induced tyrosine phosphorylation of Kv1.2 by vascular endothelial growth factor via activation of phosphatidylinositol 3-kinase." J Neurochem **87**(6): 1509-1517.
- Qiu, S. and E. J. Weeber (2007). "Reelin signaling facilitates maturation of CA1 glutamatergic synapses." J Neurophysiol **97**(3): 2312-2321.
- Randi, A. M., A. Sperone, et al. (2009). "Regulation of angiogenesis by ETS transcription factors." Biochem Soc Trans **37**(Pt 6): 1248-1253.
- Rapraeger, A. C., B. J. Ell, et al. (2013). "Vascular endothelial-cadherin stimulates syndecan-1-coupled insulin-like growth factor-1 receptor and cross-talk between alphaVbeta3 integrin and vascular endothelial growth factor receptor 2 at the onset of endothelial cell dissemination during angiogenesis." FEBS J **280**(10): 2194-2206.
- Rauner, C. and G. Kohr (2011). "Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B receptors constitute the major N-methyl-D-aspartate receptor population in adult hippocampal synapses." J Biol Chem **286**(9): 7558-7566.
- Raveendran, R., S. Devi Suma Priya, et al. (2009). "Phosphorylation status of the NR2B subunit of NMDA receptor regulates its interaction with calcium/calmodulin-dependent protein kinase II." J Neurochem **110**(1): 92-105.

- Raymond, C. R. (2007). "LTP forms 1, 2 and 3: different mechanisms for the "long" in long-term potentiation." Trends Neurosci **30**(4): 167-175.
- Regehr, W. G. and D. W. Tank (1990). "Postsynaptic NMDA receptor-mediated calcium accumulation in hippocampal CA1 pyramidal cell dendrites." Nature **345**(6278): 807-810.
- Reid, C. A., D. B. Dixon, et al. (2004). "Optical quantal analysis indicates that long-term potentiation at single hippocampal mossy fiber synapses is expressed through increased release probability, recruitment of new release sites, and activation of silent synapses." J Neurosci **24**(14): 3618-3626.
- Religa, P., R. Cao, et al. (2013). "VEGF significantly restores impaired memory behavior in Alzheimer's mice by improvement of vascular survival." Sci Rep **3**: 2053.
- Ren, S. Q., J. Z. Yan, et al. (2013). "PKClambda is critical in AMPA receptor phosphorylation and synaptic incorporation during LTP." EMBO J **32**(10): 1365-1380.
- Reyes, M. and P. K. Stanton (1996). "Induction of hippocampal long-term depression requires release of Ca<sup>2+</sup> from separate presynaptic and postsynaptic intracellular stores." J Neurosci **16**(19): 5951-5960.
- Reymann, K. G., R. Brodemann, et al. (1988). "Inhibitors of calmodulin and protein kinase C block different phases of hippocampal long-term potentiation." Brain Res **461**(2): 388-392.
- Risau, W. (1986). "Developing brain produces an angiogenesis factor." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(11): 3855-3859.
- Roberson, E. D. and J. D. Sweatt (1996). "Transient activation of cyclic AMP-dependent protein kinase during hippocampal long-term potentiation." J Biol Chem **271**(48): 30436-30441.
- Roberts, A. C., J. Diez-Garcia, et al. (2009). "Downregulation of NR3A-containing NMDARs is required for synapse maturation and memory consolidation." Neuron **63**(3): 342-356.
- Rocca, D. L., S. Martin, et al. (2008). "Inhibition of Arp2/3-mediated actin polymerization by PICK1 regulates neuronal morphology and AMPA receptor endocytosis." Nat Cell Biol **10**(3): 259-271.
- Roche, K. W., S. Standley, et al. (2001). "Molecular determinants of NMDA receptor internalization." Nat Neurosci **4**(8): 794-802.
- Rodenas-Ruano, A., A. E. Chavez, et al. (2012). "REST-dependent epigenetic remodeling promotes the developmental switch in synaptic NMDA receptors." Nat Neurosci **15**(10): 1382-1390.
- Roisin, M. P., X. Leinekugel, et al. (1997). "Implication of protein kinase C in mechanisms of potassium-induced long-term potentiation in rat hippocampal slices." Brain Res **745**(1-2): 222-230.
- Rosenberg, D., S. Artoul, et al. (2013). "Neuronal D-serine and glycine release via the Asc-1 transporter regulates NMDA receptor-dependent synaptic activity." J Neurosci **33**(8): 3533-3544.
- Rosenstein, J. M., N. Mani, et al. (2003). "Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor on organotypic cortical explants and primary cortical neurons." J Neurosci **23**(35): 11036-11044.
- Rousseau, S., F. Houle, et al. (1997). "p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells." Oncogene **15**(18): 2169-2177.

- Ruiz de Almodovar, C., C. Coulon, et al. (2010). "Matrix-binding vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms guide granule cell migration in the cerebellum via VEGF receptor Flk1." *J Neurosci* **30**(45): 15052-15066.
- Ruiz de Almodovar, C., P. J. Fabre, et al. (2011). "VEGF mediates commissural axon chemoattraction through its receptor Flk1." *Neuron* **70**(5): 966-978.
- Ruiz de Almodovar, C., D. Lambrechts, et al. (2009). "Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system." *Physiol Rev* **89**(2): 607-648.
- Rust, M. B., C. B. Gurniak, et al. (2010). "Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics." *EMBO J* **29**(11): 1889-1902.
- Sahay, A., C. H. Kim, et al. (2005). "Secreted semaphorins modulate synaptic transmission in the adult hippocampus." *J Neurosci* **25**(14): 3613-3620.
- Saito, T., K. Shibasaki, et al. (2011). "Cerebral capillary endothelial cells are covered by the VEGF-expressing foot processes of astrocytes." *Neurosci Lett* **497**(2): 116-121.
- Sakimura, K., T. Kutsuwada, et al. (1995). "Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit." *Nature* **373**(6510): 151-155.
- Sakurai, Y., K. Ohgimoto, et al. (2005). "Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(4): 1076-1081.
- Sala, C., G. Roussignol, et al. (2005). "Key role of the postsynaptic density scaffold proteins Shank and Homer in the functional architecture of Ca<sup>2+</sup> homeostasis at dendritic spines in hippocampal neurons." *J Neurosci* **25**(18): 4587-4592.
- Salikhova, A., L. Wang, et al. (2008). "Vascular endothelial growth factor and semaphorin induce neuropilin-1 endocytosis via separate pathways." *Circ Res* **103**(6): e71-79.
- Salter, M. W., Y. Dong, et al. (2009). "Regulation of NMDA Receptors by Kinases and Phosphatases."
- Samuels, B. A., Y. P. Hsueh, et al. (2007). "Cdk5 promotes synaptogenesis by regulating the subcellular distribution of the MAGUK family member CASK." *Neuron* **56**(5): 823-837.
- Saneyoshi, T. and Y. Hayashi (2012). "The Ca<sup>2+</sup> and Rho GTPase signaling pathways underlying activity-dependent actin remodeling at dendritic spines." *Cytoskeleton (Hoboken)* **69**(8): 545-554.
- Sanhueza, M., G. Fernandez-Villalobos, et al. (2011). "Role of the CaMKII/NMDA receptor complex in the maintenance of synaptic strength." *J Neurosci* **31**(25): 9170-9178.
- Sanhueza, M. and J. Lisman (2013). "The CaMKII/NMDAR complex as a molecular memory." *Mol Brain* **6**: 10.
- Sans, N., R. S. Petralia, et al. (2000). "A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses." *J Neurosci* **20**(3): 1260-1271.
- Sans, N., K. Prybylowski, et al. (2003). "NMDA receptor trafficking through an interaction between PDZ proteins and the exocyst complex." *Nat Cell Biol* **5**(6): 520-530.
- Sato, K., K. Morimoto, et al. (2000). "Increased synapsin I immunoreactivity during long-term potentiation in rat hippocampus." *Brain Res* **872**(1-2): 219-222.
- Sawamiphak, S., S. Seidel, et al. (2010). "Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis." *Nature* **465**(7297): 487-491.
- Scanziani, M., R. C. Malenka, et al. (1996). "Role of intercellular interactions in heterosynaptic long-term depression." *Nature* **380**(6573): 446-450.
- Schanzer, A., F. P. Wachs, et al. (2004). "Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor." *Brain Pathol* **14**(3): 237-248.

- Schiegg, A., W. Gerstner, et al. (1995). "Intracellular Ca<sup>2+</sup> stores can account for the time course of LTP induction: a model of Ca<sup>2+</sup> dynamics in dendritic spines." J Neurophysiol **74**(3): 1046-1055.
- Schmid-Brunclik, N., C. Burgi-Taboada, et al. (2008). "Astrocyte responses to injury: VEGF simultaneously modulates cell death and proliferation." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **295**(3): R864-873.
- Schmitz, D., J. Mellor, et al. (2003). "Presynaptic kainate receptors impart an associative property to hippocampal mossy fiber long-term potentiation." Nat Neurosci **6**(10): 1058-1063.
- Schwarz, Q., C. Gu, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor controls neuronal migration and cooperates with Sema3A to pattern distinct compartments of the facial nerve." Genes Dev **18**(22): 2822-2834.
- Schwarz, Q., J. M. Vieira, et al. (2008). "Neuropilin 1 and 2 control cranial gangliogenesis and axon guidance through neural crest cells." Development **135**(9): 1605-1613.
- Scott, D. B., T. A. Blanpied, et al. (2003). "Coordinated PKA and PKC phosphorylation suppresses RXR-mediated ER retention and regulates the surface delivery of NMDA receptors." Neuropharmacology **45**(6): 755-767.
- Scott, D. B., T. A. Blanpied, et al. (2001). "An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing." J Neurosci **21**(9): 3063-3072.
- Sears, H. C., C. J. Kennedy, et al. (2003). "Macrophage-mediated corpse engulfment is required for normal Drosophila CNS morphogenesis." Development **130**(15): 3557-3565.
- Sekino, Y., N. Kojima, et al. (2007). "Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis." Neurochem Int **51**(2-4): 92-104.
- Selcher, J. C., W. Xu, et al. (2012). "Glutamate receptor subunit GluA1 is necessary for long-term potentiation and synapse unsilencing, but not long-term depression in mouse hippocampus." Brain Res **1435**: 8-14.
- Senger, D. R., K. P. Claffey, et al. (1997). "Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 13612-13617.
- Senger, D. R., S. J. Galli, et al. (1983). "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid." Science **219**(4587): 983-985.
- Senger, D. R., S. R. Ledbetter, et al. (1996). "Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin." Am J Pathol **149**(1): 293-305.
- Serafini, T., T. E. Kennedy, et al. (1994). "The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to C. elegans UNC-6." Cell **78**(3): 409-424.
- Seugnet, L., Y. Suzuki, et al. (2009). "Aversive phototaxis suppression: evaluation of a short-term memory assay in Drosophila melanogaster." Genes Brain Behav **8**(4): 377-389.
- Shalaby, F., J. Rossant, et al. (1995). "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice." Nature **376**(6535): 62-66.
- Sharma, A., J. Verhaagen, et al. (2012). "Receptor complexes for each of the Class 3 Semaphorins." Front Cell Neurosci **6**: 28.
- Shen, K. and T. Meyer (1999). "Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation." Science **284**(5411): 162-166.
- Sheng, M. and E. Kim (2011). "The postsynaptic organization of synapses." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(12).



- Shibuya, M. (2001). "Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1)." *Int J Biochem Cell Biol* **33**(4): 409-420.
- Shweiki, D., A. Itin, et al. (1993). "Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis." *J Clin Invest* **91**(5): 2235-2243.
- Silva, A. J., R. Paylor, et al. (1992). "Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice." *Science* **257**(5067): 206-211.
- Silva, A. J., C. F. Stevens, et al. (1992). "Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice." *Science* **257**(5067): 201-206.
- Silverman, W. F., J. M. Krum, et al. (1999). "Vascular, glial and neuronal effects of vascular endothelial growth factor in mesencephalic explant cultures." *Neuroscience* **90**(4): 1529-1541.
- Skeberdis, V. A., V. Chevalere, et al. (2006). "Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors." *Nat Neurosci* **9**(4): 501-510.
- Skeberdis, V. A., J. Lan, et al. (2001). "mGluR1-mediated potentiation of NMDA receptors involves a rise in intracellular calcium and activation of protein kinase C." *Neuropharmacology* **40**(7): 856-865.
- Slevin, M., J. Krupinski, et al. (2000). "Activation of MAP kinase (ERK-1/ERK-2), tyrosine kinase and VEGF in the human brain following acute ischaemic stroke." *Neuroreport* **11**(12): 2759-2764.
- Smirnova, T., S. Laroche, et al. (1993). "Transsynaptic expression of a presynaptic glutamate receptor during hippocampal long-term potentiation." *Science* **262**(5132): 433-436.
- Soker, S., S. Takashima, et al. (1998). "Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor." *Cell* **92**(6): 735-745.
- Soldi, R., S. Mitola, et al. (1999). "Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2." *EMBO J* **18**(4): 882-892.
- Soler-Llavina, G. J., P. Arstikaitis, et al. (2013). "Leucine-rich repeat transmembrane proteins are essential for maintenance of long-term potentiation." *Neuron* **79**(3): 439-446.
- Sondell, M., G. Lundborg, et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system." *J Neurosci* **19**(14): 5731-5740.
- Sondell, M., F. Sundler, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor." *Eur J Neurosci* **12**(12): 4243-4254.
- Song, S., K. D. Miller, et al. (2000). "Competitive Hebbian learning through spike-timing-dependent synaptic plasticity." *Nat Neurosci* **3**(9): 919-926.
- Soro, S., A. Orecchia, et al. (2008). "A proangiogenic peptide derived from vascular endothelial growth factor receptor-1 acts through alpha5beta1 integrin." *Blood* **111**(7): 3479-3488.
- Stalmans, I., Y. S. Ng, et al. (2002). "Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms." *J Clin Invest* **109**(3): 327-336.
- Stamatakou, E., A. Marzo, et al. (2013). "Activity-dependent spine morphogenesis: a role for the actin-capping protein Eps8." *J Neurosci* **33**(6): 2661-2670.
- Standley, S., K. W. Roche, et al. (2000). "PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants." *Neuron* **28**(3): 887-898.

- Stanton, P. K. (1995). "Transient protein kinase C activation primes long-term depression and suppresses long-term potentiation of synaptic transmission in hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1724-1728.
- Storkebaum, E., D. Lambrechts, et al. (2005). "Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS." Nat Neurosci **8**(1): 85-92.
- Strack, S. and R. J. Colbran (1998). "Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor." J Biol Chem **273**(33): 20689-20692.
- Stringer, J. L. and P. G. Guyenet (1983). "Elimination of long-term potentiation in the hippocampus by phencyclidine and ketamine." Brain Res **258**(1): 159-164.
- Stuttfeld, E. and K. Ballmer-Hofer (2009). "Structure and function of VEGF receptors." IUBMB Life **61**(9): 915-922.
- Suh, Y. H., A. Terashima, et al. (2010). "A neuronal role for SNAP-23 in postsynaptic glutamate receptor trafficking." Nat Neurosci **13**(3): 338-343.
- Sun, G. C. and Y. Y. Ma (2013). "Vascular endothelial growth factor modulates voltage-gated Na(+) channel properties and depresses action potential firing in cultured rat hippocampal neurons." Biol Pharm Bull **36**(4): 548-555.
- Sun, J., B. Sha, et al. (2010). "VEGF-mediated angiogenesis stimulates neural stem cell proliferation and differentiation in the premature brain." Biochem Biophys Res Commun **394**(1): 146-152.
- Svitkina, T., W. H. Lin, et al. (2010). "Regulation of the postsynaptic cytoskeleton: roles in development, plasticity, and disorders." J Neurosci **30**(45): 14937-14942.
- Tam, S. J. and R. J. Watts (2010). "Connecting vascular and nervous system development: angiogenesis and the blood-brain barrier." Annu Rev Neurosci **33**: 379-408.
- Tammela, T., G. Zarkada, et al. (2011). "VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signalling." Nat Cell Biol **13**(10): 1202-1213.
- Tamura, T., D. Horiuchi, et al. (2010). "Drosophila PQBP1 regulates learning acquisition at projection neurons in aversive olfactory conditioning." J Neurosci **30**(42): 14091-14101.
- Tan, W. H., A. S. Popel, et al. (2013). "Computational model of VEGFR2 pathway to ERK activation and modulation through receptor trafficking." Cell Signal **25**(12): 2496-2510.
- Tanaka, J., Y. Horiike, et al. (2008). "Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines." Science **319**(5870): 1683-1687.
- Tang, T. T., F. Yang, et al. (2009). "Dysbindin regulates hippocampal LTP by controlling NMDA receptor surface expression." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(50): 21395-21400.
- Tatavarty, V., S. Das, et al. (2012). "Polarization of actin cytoskeleton is reduced in dendritic protrusions during early spine development in hippocampal neuron." Mol Biol Cell **23**(16): 3167-3177.
- Teodoro, R. O., G. Pekkurnaz, et al. (2013). "Ral mediates activity-dependent growth of postsynaptic membranes via recruitment of the exocyst." EMBO J **32**(14): 2039-2055.
- Teyler, T. J., I. Cavus, et al. (1994). "Multideterminant role of calcium in hippocampal synaptic plasticity." Hippocampus **4**(6): 623-634.
- Thau-Zuchman, O., E. Shohami, et al. (2010). "Vascular endothelial growth factor increases neurogenesis after traumatic brain injury." J Cereb Blood Flow Metab **30**(5): 1008-1016.

- Thiels, E., B. I. Kanterewicz, et al. (2000). "Protein phosphatase-mediated regulation of protein kinase C during long-term depression in the adult hippocampus in vivo." *J Neurosci* **20**(19): 7199-7207.
- Thomas, C. G., A. J. Miller, et al. (2006). "Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons." *J Neurophysiol* **95**(3): 1727-1734.
- Tillo, M., C. Ruhrberg, et al. (2012). "Emerging roles for semaphorins and VEGFs in synaptogenesis and synaptic plasticity." *Cell Adh Migr* **6**(6): 541-546.
- Tomanek, R. J., A. Ratajska, et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor expression coincides with coronary vasculogenesis and angiogenesis." *Dev Dyn* **215**(1): 54-61.
- Tominaga-Yoshino, K., S. Kondo, et al. (2002). "Repetitive activation of protein kinase A induces slow and persistent potentiation associated with synaptogenesis in cultured hippocampus." *Neurosci Res* **44**(4): 357-367.
- Toni, N., P. A. Buchs, et al. (1999). "LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite." *Nature* **402**(6760): 421-425.
- Toni, N., P. A. Buchs, et al. (2001). "Remodeling of synaptic membranes after induction of long-term potentiation." *J Neurosci* **21**(16): 6245-6251.
- Tovar, K. R. and G. L. Westbrook (1999). "The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro." *J Neurosci* **19**(10): 4180-4188.
- Tovar, K. R. and G. L. Westbrook (2002). "Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses." *Neuron* **34**(2): 255-264.
- Toyofuku, T., M. Yabuki, et al. (2007). "Semaphorin-4A, an activator for T-cell-mediated immunity, suppresses angiogenesis via Plexin-D1." *EMBO J* **26**(5): 1373-1384.
- Tran, T. S., M. E. Rubio, et al. (2009). "Secreted semaphorins control spine distribution and morphogenesis in the postnatal CNS." *Nature* **462**(7276): 1065-1069.
- Tsai, G. and J. T. Coyle (2002). "Glutamatergic mechanisms in schizophrenia." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 165-179.
- van Praag, H., B. R. Christie, et al. (1999). "Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(23): 13427-13431.
- Verpelli, C., M. J. Schmeisser, et al. (2012). "Scaffold proteins at the postsynaptic density." *Adv Exp Med Biol* **970**: 29-61.
- Viikki, M., S. Anttila, et al. (2010). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) polymorphism is associated with treatment resistant depression." *Neurosci Lett* **477**(3): 105-108.
- Vissel, B., J. J. Krupp, et al. (2001). "A use-dependent tyrosine dephosphorylation of NMDA receptors is independent of ion flux." *Nat Neurosci* **4**(6): 587-596.
- Vlahakis, N. E., B. A. Young, et al. (2007). "Integrin  $\alpha 9 \beta 1$  directly binds to vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and contributes to VEGF-A-induced angiogenesis." *J Biol Chem* **282**(20): 15187-15196.
- von Engelhardt, J., B. Doganci, et al. (2008). "Contribution of hippocampal and extra-hippocampal NR2B-containing NMDA receptors to performance on spatial learning tasks." *Neuron* **60**(5): 846-860.
- Wang, C. C., R. G. Held, et al. (2011). "A critical role for GluN2B-containing NMDA receptors in cortical development and function." *Neuron* **72**(5): 789-805.
- Wang, C. Y., K. Chang, et al. (2006). "A novel family of adhesion-like molecules that interacts with the NMDA receptor." *J Neurosci* **26**(8): 2174-2183.
- Wang, K. H., K. Brose, et al. (1999). "Biochemical purification of a mammalian slit protein as a positive regulator of sensory axon elongation and branching." *Cell* **96**(6): 771-784.



- Wang, Y., M. Nakayama, et al. (2010). "Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis." *Nature* **465**(7297): 483-486.
- Washbourne, P., J. E. Bennett, et al. (2002). "Rapid recruitment of NMDA receptor transport packets to nascent synapses." *Nat Neurosci* **5**(8): 751-759.
- Washbourne, P., A. Dityatev, et al. (2004). "Cell adhesion molecules in synapse formation." *J Neurosci* **24**(42): 9244-9249.
- Watanabe, Y., T. Himi, et al. (1992). "Involvement of glycine site associated with the NMDA receptor in hippocampal long-term potentiation and acquisition of spatial memory in rats." *Brain Res* **582**(1): 58-64.
- Wehner, J. M., S. Sleight, et al. (1990). "Hippocampal protein kinase C activity is reduced in poor spatial learners." *Brain Res* **523**(2): 181-187.
- Weickert, C. S., S. J. Fung, et al. (2013). "Molecular evidence of N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction in schizophrenia." *Mol Psychiatry* **18**(11): 1185-1192.
- Weitlauf, C., Y. Honse, et al. (2005). "Activation of NR2A-containing NMDA receptors is not obligatory for NMDA receptor-dependent long-term potentiation." *J Neurosci* **25**(37): 8386-8390.
- Wenzel, A., J. M. Fritschy, et al. (1997). "NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins." *J Neurochem* **68**(2): 469-478.
- Wenzel, J., G. Lammert, et al. (1991). "The influence of long-term potentiation on the spatial relationship between astrocyte processes and potentiated synapses in the dentate gyrus neuropil of rat brain." *Brain Res* **560**(1-2): 122-131.
- Whitford, K. L., V. Marillat, et al. (2002). "Regulation of cortical dendrite development by Slit-Robo interactions." *Neuron* **33**(1): 47-61.
- Wick, A., W. Wick, et al. (2002). "Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt." *J Neurosci* **22**(15): 6401-6407.
- Wild, J. R., C. A. Staton, et al. (2012). "Neuropilins: expression and roles in the epithelium." *Int J Exp Pathol* **93**(2): 81-103.
- Williams, J. H., Y. G. Li, et al. (1993). "The suppression of long-term potentiation in rat hippocampus by inhibitors of nitric oxide synthase is temperature and age dependent." *Neuron* **11**(5): 877-884.
- Williams, K., S. L. Russell, et al. (1993). "Developmental switch in the expression of NMDA receptors occurs in vivo and in vitro." *Neuron* **10**(2): 267-278.
- Wilson, B. D., M. Li, et al. (2006). "Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis." *Science* **313**(5787): 640-644.
- Wisden, W., M. L. Errington, et al. (1990). "Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord." *Neuron* **4**(4): 603-614.
- Wittko-Schneider, I. M., F. T. Schneider, et al. (2013). "Brain homeostasis: VEGF receptor 1 and 2-two unequal brothers in mind." *Cell Mol Life Sci* **70**(10): 1705-1725.
- Wittko, I. M., A. Schanzer, et al. (2009). "VEGFR-1 regulates adult olfactory bulb neurogenesis and migration of neural progenitors in the rostral migratory stream in vivo." *J Neurosci* **29**(27): 8704-8714.
- Wu, C. L., S. Xia, et al. (2007). "Specific requirement of NMDA receptors for long-term memory consolidation in Drosophila ellipsoid body." *Nat Neurosci* **10**(12): 1578-1586.
- Wuestefeld, R., J. Chen, et al. (2012). "Impact of vegf on astrocytes: analysis of gap junctional intercellular communication, proliferation, and motility." *Glia* **60**(6): 936-947.

- Xia, S., T. Miyashita, et al. (2005). "NMDA receptors mediate olfactory learning and memory in *Drosophila*." *Curr Biol* **15**(7): 603-615.
- Xiao, Z., Y. Kong, et al. (2007). "Upregulation of Flk-1 by bFGF via the ERK pathway is essential for VEGF-mediated promotion of neural stem cell proliferation." *Cell Res* **17**(1): 73-79.
- Xu, J. Y., P. Zheng, et al. (2003). "Vascular endothelial growth factor inhibits outward delayed-rectifier potassium currents in acutely isolated hippocampal neurons." *Neuroscience* **118**(1): 59-67.
- Yamagata, Y., S. Kobayashi, et al. (2009). "Kinase-dead knock-in mouse reveals an essential role of kinase activity of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II $\alpha$  in dendritic spine enlargement, long-term potentiation, and learning." *J Neurosci* **29**(23): 7607-7618.
- Yan, J. Z., Z. Xu, et al. (2011). "Protein kinase C promotes N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor trafficking by indirectly triggering calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) autophosphorylation." *J Biol Chem* **286**(28): 25187-25200.
- Yang, S. Z., L. M. Zhang, et al. (2003). "Distribution of Flk-1 and Flt-1 receptors in neonatal and adult rat brains." *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **274**(1): 851-856.
- Yang, W., C. Zheng, et al. (2007). "A three amino acid tail following the TM4 region of the N-methyl-D-aspartate receptor (NR) 2 subunits is sufficient to overcome endoplasmic reticulum retention of NR1-1a subunit." *J Biol Chem* **282**(12): 9269-9278.
- Yuan, H., K. B. Hansen, et al. (2009). "Control of NMDA receptor function by the NR2 subunit amino-terminal domain." *J Neurosci* **29**(39): 12045-12058.
- Yuan, L., D. Moyon, et al. (2002). "Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice." *Development* **129**(20): 4797-4806.
- Zakharenko, S. S., L. Zablow, et al. (2001). "Visualization of changes in presynaptic function during long-term synaptic plasticity." *Nat Neurosci* **4**(7): 711-717.
- Zhang, C., Z. Li, et al. (2013). "A study of N-methyl-D-aspartate receptor gene (GRIN2B) variants as predictors of treatment-resistant major depression." *Psychopharmacology (Berl)*.
- Zhang, H., L. Vutskits, et al. (2003). "VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors." *J Cell Biol* **163**(6): 1375-1384.
- Zhang, S., L. Edelmann, et al. (2008). "Cdk5 regulates the phosphorylation of tyrosine 1472 NR2B and the surface expression of NMDA receptors." *J Neurosci* **28**(2): 415-424.
- Zhou, L., F. Li, et al. (2010). "Treatment of cerebral ischemia by disrupting ischemia-induced interaction of nNOS with PSD-95." *Nat Med* **16**(12): 1439-1443.
- Zhou, M., Z. Lei, et al. (2010). "NMDA receptors-dependent plasticity in the phototaxis preference behavior induced by visual deprivation in young and adult flies." *Genes Brain Behav* **9**(3): 325-334.
- Zhou, Y., R. A. Gunput, et al. (2008). "Semaphorin signaling: progress made and promises ahead." *Trends Biochem Sci* **33**(4): 161-170.
- Zhuo, M., S. A. Small, et al. (1993). "Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus." *Science* **260**(5116): 1946-1950.

# VEGF modulates NMDA receptors activity in cerebellar granule cells through Src-family kinases before synapse formation

Claire Meissirel<sup>a,b,1,2</sup>, Carmen Ruiz de Almodovar<sup>c,d,1</sup>, Ellen Knevels<sup>c,d,1</sup>, Cathy Coulon<sup>c,d</sup>, Naura Chounlamountri<sup>a,b</sup>, Inmaculada Segura<sup>c,d</sup>, Pierre de Rossi<sup>a,b</sup>, Stefan Vinckier<sup>c,d</sup>, Kristof Anthonis<sup>c,d</sup>, Bérangère Deléglise<sup>a,b</sup>, Maria de Mol<sup>c,d</sup>, Carine Ali<sup>e,f,g</sup>, Karel Dassonville<sup>a,b</sup>, Ellen Loyens<sup>h</sup>, Jérôme Honnorat<sup>a,b</sup>, Yvette Michotte<sup>h</sup>, Véronique Rogemond<sup>a,b</sup>, Ilse Smolders<sup>h</sup>, Thomas Voets<sup>i</sup>, Denis Vivien<sup>e,f,g</sup>, Pieter Vanden Berghe<sup>j</sup>, Ludo Van Den Bosch<sup>d,k</sup>, Wim Robberecht<sup>d,k,l</sup>, Alain Chédotal<sup>m</sup>, Salvatore Oliviero<sup>n</sup>, Mieke Dewerchin<sup>c,d</sup>, Dietmar Schmucker<sup>d,o</sup>, Nicole Thomasset<sup>a,b,1</sup>, Paul Salin<sup>a,b,p,1</sup>, and Peter Carmeliet<sup>c,d,1,2</sup>

<sup>a</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 1028, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5292, Neurooncology and Neuroinflammation, Lyon Neuroscience Research Center, F-69000 Lyon, France; <sup>b</sup>University Lyon 1, F-69000 Lyon, France; <sup>c</sup>Laboratory for Angiogenesis and Neurovascular Link, <sup>d</sup>Laboratory of Neurobiology, and <sup>e</sup>Laboratory of Neuronal Wiring, <sup>f</sup>Vesalius Research Center, VIB, K.U. Leuven, B-3000 Leuven, Belgium; <sup>g</sup>INSERM, Unité 919, Serine Proteases and Pathophysiology of the Neurovascular Unit, and <sup>h</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 6232, Center for Imaging Neurosciences and Applications to Pathologies, Cyseron, F-14074 Caen Cedex, France; <sup>i</sup>University of Caen Basse-Normandie, F-14074 Caen Cedex, France; <sup>j</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry, Drug Analysis, and Drug Information, Vrije Universiteit Brussel, 1090 Brussels, Belgium; <sup>k</sup>Laboratory of Ion Channel Research, and <sup>l</sup>Center for Gastroenterological Research, Katholieke Universiteit Leuven, B-3000 Leuven, Belgium; <sup>m</sup>Department of Neurology, University Hospital Leuven, B-3000 Leuven, Belgium; <sup>n</sup>INSERM, Unité Mixte de Recherche S968, Department of Development, Institute of Vision, F-75012 Paris, France; <sup>o</sup>Department of Molecular Biology, Università di Siena, 53100 Siena, Italy; and <sup>p</sup>INSERM Unité 1028, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5292, Physiopathology of the Sleep Neuronal Networks, Lyon Neuroscience Research Center, F-69000 Lyon, France

Edited\* by Don W. Cleveland, University of California at San Diego, La Jolla, CA, and approved July 7, 2011 (received for review January 15, 2011)

**NMDA type glutamate receptors (NMDARs) are best known for their role in synaptogenesis and synaptic plasticity. Much less is known about their developmental role before neurons form synapses. We report here that VEGF, which promotes migration of granule cells (GCs) during postnatal cerebellar development, enhances NMDAR-mediated currents and  $\text{Ca}^{2+}$  influx in immature GCs before synapse formation. The VEGF receptor Flk1 forms a complex with the NMDAR subunits NR1 and NR2B. In response to VEGF, the number of Flk1/NR2B coclusters on the cell surface increases. Stimulation of Flk1 by VEGF activates Src-family kinases, which increases tyrosine phosphorylation of NR2B. Inhibition of Src-family kinases abolishes the VEGF-dependent NR2B phosphorylation and amplification of NMDAR-mediated currents and  $\text{Ca}^{2+}$  influx in GCs. These findings identify VEGF as a modulator of NMDARs before synapse formation and highlight a link between an activity-independent neurovascular guidance cue (VEGF) and an activity-regulated neurotransmitter receptor (NMDAR).**

angiogenesis | neurovascular link | neuronal migration | cerebellum

**V**EGF and its receptor Flk1 (VEGFR-2) regulate several neurobiological processes in normal and pathological conditions (1). They stimulate neurogenesis, long-term potentiation, and learning, whereas low VEGF levels cause or aggravate motoneuron degeneration, and VEGF delivery delays paralysis in preclinical models (1). During cerebellar development, VEGF chemoattracts granule cells (GCs) from the external GC layer (EGL) toward the internal GC layer (IGL) (2). This chemotactic activity of VEGF for GCs in vivo is mediated by direct activation of Flk1 in GCs, independently of its angiogenic activity (2). However, the mechanisms via which VEGF regulates GC migration in the cerebellum remain unknown.

NMDA type glutamate receptors (NMDARs) are ligand-gated ion channels, permeable for  $\text{Ca}^{2+}$  (and other) ions that have been implicated in synaptic transmission and plasticity (3, 4), and may induce excitotoxicity upon excessive activation (5). Interestingly, before neurons establish synapses, activation of NMDARs results in  $\text{Ca}^{2+}$  influx ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), which promotes, among other processes, proliferation and survival of neuroblasts (6, 7), filopodia formation and growth cone turning (8, 9), and migration of cortical and cerebellar neurons (10–13). In general, NMDARs have been less extensively studied before synapse

formation than at developing or established synapses (14–16). It remains to be established whether NMDARs can be regulated by guidance cues during neuronal migration and, if so, the mechanism via which this process occurs has not been explored.

Prompted by findings that VEGF (1) and NMDARs (3, 17, 18) regulate neurogenesis, plasticity, and repair, we hypothesized that Flk1 activation might regulate NMDAR function. Because both NMDARs (NR1 and NR2B subunits) and Flk1 are expressed by migrating GCs (2, 19, 20) and regulate GC migration (2, 11–13), we explored a possible link between VEGF and NMDARs in GCs before synaptogenesis, when there are no excitatory glutamatergic synaptic inputs on GCs (21). Our findings identify VEGF as a modulator of NMDAR function in neurons before synapses are formed. We identify a unique interaction between receptors for a classic neurotransmitter and a prototypic angiogenic factor, which regulate neuronal migration in the developing cerebellum.

## Results

**VEGF Enhances NMDAR-Mediated  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and Currents in GCs.** To explore whether VEGF affects GC migration in part by modulating the NMDA response of migrating GCs, we examined by fura-2 fluorescence imaging whether activation of Flk1 by VEGF enhances  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  via NMDARs in GCs. Isolated GCs from postnatal day 5 (P5) mice, cultured for 1.0–1.5 d in vitro (DIV), express markers for EGL-like postmitotic GCs (22) but have not formed functional synapses yet (22, 23). Because VEGF can stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores (24, 25) and  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  through

Author contributions: C.M., C.R.d.A., E.K., C.C., I. Segura, S.V., M.d.M., C.A., J.H., I. Smolders, T.V., D.V., P.V.B., L.V.D.B., W.R., A.C., M.D., D.S., N.T., P.S., and P.C. designed research; C.M., C.R.d.A., E.K., C.C., N.C., I. Segura, P.d.R., S.V., K.A., B.D., M.d.M., K.D., E.L., Y.M., V.R., P.V.B., and P.S. performed research; J.H., I. Smolders, S.O., D.S., and N.T. contributed new reagents/analytic tools; C.M., C.R.d.A., E.K., C.C., C.A., T.V., D.V., P.V.B., L.V.D.B., W.R., A.C., M.D., D.S., N.T., and P.S. analyzed data; and C.M., C.R.d.A., P.S., and P.C. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

\*This Direct Submission article had a prearranged editor.

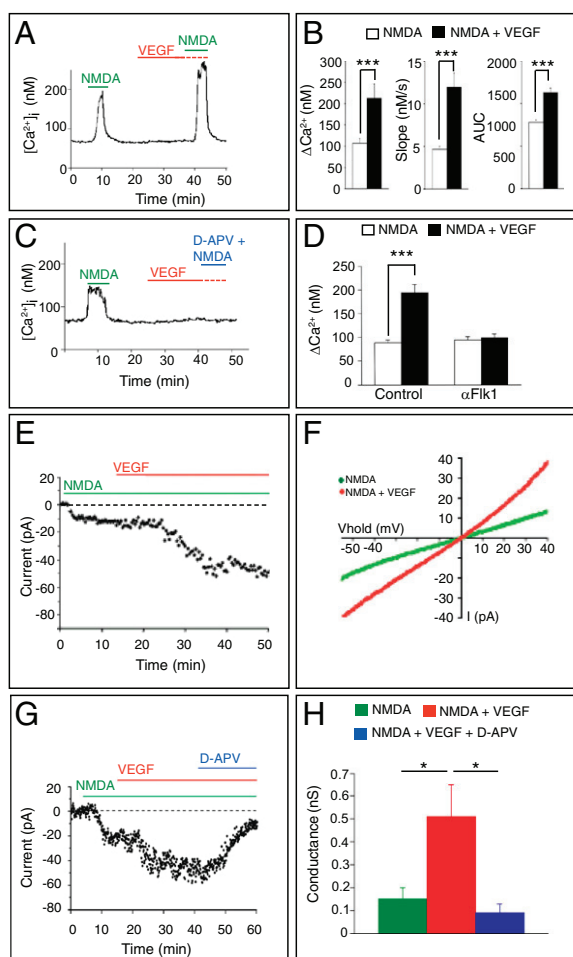
<sup>1</sup>C.M., C.R.d.A., E.K., N.T., P.S., and P.C. contributed equally to the work.

<sup>2</sup>To whom correspondence may be addressed. E-mail: claire.meissirel@inserm.fr or peter.carmeliet@vib-kuleuven.be.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1100341108/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1100341108/-DCSupplemental).



other channels than NMDARs (24, 26, 27), we selected a concentration of VEGF that, by itself, failed to elevate  $[Ca^{2+}]_i$  in GCs. GCs were stimulated with a pulse of NMDA, exposed to vehicle or VEGF, and thereafter exposed again to NMDA. The increased  $[Ca^{2+}]_i$  response to NMDA was comparable for the first and second pulse (Fig. S14). However, when GCs were exposed to VEGF before the second NMDA pulse, the  $[Ca^{2+}]_i$  response to the second pulse was increased compared with the first (Fig. 1A and B), suggesting that VEGF enhanced NMDAR-mediated  $[Ca^{2+}]_i$ .



**Fig. 1.** VEGF enhances NMDA-stimulated  $[Ca^{2+}]_i$  and NMDAR-mediated currents in GCs. (A) Representative single GC tracing of intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  levels obtained by  $Ca^{2+}$  imaging. GCs were stimulated with NMDA, exposed to control buffer or VEGF, and stimulated a second time with NMDA. VEGF amplified the second NMDA response. (B) Quantification of the VEGF response. (Left) The difference between maximum  $[Ca^{2+}]_i$  level and baseline  $[Ca^{2+}]_i$  level ( $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ) was increased with VEGF ( $n = 26$ ,  $***P < 0.001$ ). (Center) The maximal derivative of the rise in  $[Ca^{2+}]_i$  levels ( $d[Ca^{2+}]_i/dt$ ), the slope, was enhanced with VEGF ( $n = 26$ ,  $***P < 0.001$ ). (Right) The area under the curve (AUC) was also increased with VEGF ( $n = 26$ ,  $***P < 0.001$ ). (C) Single GC tracing of  $[Ca^{2+}]_i$  showing blockage of  $[Ca^{2+}]_i$  by D-APV. (D) Measurements of  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  revealing inhibition of VEGF-dependent increase in  $[Ca^{2+}]_i$  by  $\alpha$ Flk1 but not by control IgG ( $n = 44$ ,  $***P < 0.001$  for IgG;  $n = 50$ ,  $P$  = not significant for  $\alpha$ Flk1). (E) Representative whole-cell patch-clamp recording of a GC in the lower EGL, revealing enhancement of the NMDA-induced current by VEGF. (F) Current-voltage relationship of the GC responses shown in E revealing increased inward currents in response to NMDA plus VEGF compared with NMDA alone ( $n = 26$ ,  $***P < 0.001$ ). (G) Representative whole-cell patch-clamp recording showing that D-APV blocked the VEGF-enhancement of the NMDAR-mediated current. (H) NMDA conductance was higher after VEGF plus NMDA than after NMDA alone; this conductance was blocked by D-APV ( $n = 7$ ;  $*P < 0.05$  in VEGF + NMDA vs. NMDA;  $*P < 0.05$  in VEGF + NMDA vs. VEGF + NMDA + D-APV).

Control experiments showed that the NMDAR antagonist D-2-amino-5-phosphono-valerate (D-APV), added during the second NMDA pulse, abrogated the VEGF plus NMDA response (Fig. 1C), demonstrating that the VEGF effect is mediated via NMDARs. Incubation with an anti-Flk1 blocking antibody ( $\alpha$ Flk1) (28), but not a control IgG, for 15 min before and during VEGF stimulation, blocked the VEGF-dependent increase in  $[Ca^{2+}]_i$  (Fig. 1D and Fig. S1B and C), revealing that binding of VEGF to its receptor Flk1 is required.  $\alpha$ Flk1 did not alter NMDAR channel properties because it did not further reduce the NMDA signal (Fig. 1D and Fig. S1C). Similar findings were obtained when using the VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787 (PTK) (Fig. S1D), showing that Flk1 signaling is required for the VEGF effect.

To further dissect the molecular characteristics of this VEGF-mediated effect on NMDAR, we reconstructed the cross-talk in cells by cotransfecting HEK-293 cells with NR1 and NR2B, with Flk1, or with the three together. When HEK-293 cells were cotransfected with only NR1 and NR2B, VEGF failed to potentiate the  $[Ca^{2+}]_i$ , indicating that VEGF did not directly affect NMDAR (Fig. S2A). Conversely, VEGF failed to increase  $[Ca^{2+}]_i$  in cells transfected only with Flk1, indicating that VEGF did not induce a change in  $[Ca^{2+}]_i$  by itself but required the presence of NMDARs (Fig. S2B). When all players were cotransfected, VEGF amplified the NMDA-induced  $[Ca^{2+}]_i$  (Fig. S2C). Without VEGF, the second pulse of NMDA did not increase  $[Ca^{2+}]_i$  above the level induced by the first pulse (Fig. S2D). Thus, VEGF potentiates NMDAR-mediated  $[Ca^{2+}]_i$  in GCs before synapse formation and in cotransfected HEK-293 cells via Flk1 signaling.

We also confirmed that the VEGF-dependent enhancement of NMDAR activity was operational in GCs in situ. In the cerebellum, Flk1 is present in migrating GCs, whereas Flt1/VEGFR-1 is not detectable (2). We used whole-cell patch-clamp techniques in acute cerebellar slices of P9–P10 mice to record NMDA-evoked currents in GCs in the lower layer of the EGL, before synapse formation (21). Because no synaptic events were recorded in GCs from the lower EGL (Fig. S3A and B), consistent with the absence of synaptic input in migrating GCs (21), we superfused NMDA and its receptor antagonist D-APV and applied VEGF topically to minimize possible indirect effects. Application of VEGF alone induced only a small inward current (Fig. S3C–E). Consistent with previous reports (20, 29), NMDA evoked an inward current in GCs in the lower EGL (Fig. 1E–H). Notably, VEGF enhanced the NMDA-induced current already within 10–15 min by more than twofold (Fig. 1E–H). This VEGF-induced potentiation was observed when NMDA was used at 50  $\mu$ M or lower concentrations (Fig. S4A) and was blocked by D-APV (Fig. 1G and H), indicating that the VEGF response in GCs is mediated through NMDARs.

To evaluate whether the effect of VEGF on NMDAR is mediated by Flk1 signaling, we silenced Flk1 in GCs by ex vivo electroporation (2). We generated a shRNA construct to silence Flk1 ( $Flk1^{KD}$ ) and used a scramble as control ( $Flk1^{Ctl}$ ). Validation experiments showed detectable Flk1 protein levels in HEK-293 cells transfected with a Flk1-expression plasmid and  $Flk1^{Ctl}$  (Fig. S4B). In contrast, cotransfection with  $Flk1^{KD}$ -expression plasmid and  $Flk1^{KD}$  abolished Flk1 expression (Fig. S4B), indicating silencing by  $Flk1^{KD}$ . These constructs were coelectroporated with an EGFP expression vector in cerebella ex vivo, and cerebellar slices were cultured as described (2). After 3 d in culture, whole-cell patch-clamp recordings of GFP<sup>+</sup> GCs in the lower EGL showed that Flk1 silencing abrogated the VEGF-induced potentiation of NMDAR-mediated currents (Fig. S4C). Thus, the VEGF-evoked increase in  $[Ca^{2+}]_i$  and currents in GCs require Flk1 and are mediated via NMDARs before synapse formation.

**Flk1 Interacts with NMDARs.** Prompted by the link between VEGF and NMDAR, we assessed whether Flk1 associates with NMDARs in GCs. During cerebellar development, Flk1 and NR2B are expressed in migrating GCs and are needed for GC migration (2, 12, 13). Both molecules were found to be coexpressed by GCs

when migrating along Bergmann glia fibers in vitro (Fig. 2A). We therefore focused on NR2B. We immunoprecipitated Flk1 from GCs, or from cotransfected HEK-293 cells, and immunoblotted these precipitates with anti-NR1 or anti-NR2B antibodies. NMDAR subunits coimmunoprecipitated with Flk1 in both cell types, whereas a control antibody was ineffective (Fig. 2B and C). Similar results were obtained when anti-NR2B was used for immunoprecipitation and anti-Flk1 was used for immunoblotting (data not shown), indicating that Flk1 and NR1/NR2B associate with each other.

We next investigated whether Flk1 and NMDARs cluster together on the cell surface of GCs, before forming synapses. Because VEGF enhanced NMDAR-mediated  $[Ca^{2+}]_i$  and currents in GCs within 10–15 min after application, we stimulated GCs (1 DIV) for 10 min with VEGF and stained nonpermeabilized GCs for Flk1 and NR2B. High-resolution imaging was used to determine receptor clusters by using established methods (14) (Fig. S5A–H). In baseline, Flk1 was present on the cell surface but only a few Flk1 clusters were formed, NR2B clusters were readily detected, and only a few Flk1/NR2B coclusters were present (Fig. 2D). Notably, VEGF increased the number of Flk1 clusters and Flk1/NR2B coclusters, without affecting the number of NR2B clusters (Fig. 2D). Exposure of GC growth cones to VEGF-soaked heparin beads also increased the surface expression of NR2B and Flk1 (Fig. S5I and J). Thus, Flk1 interacts with NR1 and NR2B, and VEGF increases the number of Flk1/NR2B coclusters on the GC surface.

**Flk1 Activation by VEGF Enhances NR2B Phosphorylation via Src-Family Kinases (SFKs).** Phosphorylation of NMDARs by SFKs increases NMDAR-mediated currents and  $[Ca^{2+}]_i$  (30, 31). SFKs phosphorylate tyrosine residues in the intracellular tail of NR2B, leading to a greater number of active NMDAR channels at the cell surface (32, 33). We thus examined whether the amplification of the NMDAR-dependent  $[Ca^{2+}]_i$  by VEGF/Flk1 in GCs relied on

an increase in NR2B tyrosine phosphorylation by SFKs. VEGF activated SFKs in GCs, as revealed by the increased SFK-Tyr<sup>416</sup> phosphorylation (Fig. 3A). To explore whether VEGF also stimulates phosphorylation of NR2B, GC lysates were immunoprecipitated with an antibody for phosphorylated tyrosine (pTyr), and precipitates were immunoblotted for NR2B. As shown in Fig. 3B, VEGF increased NR2B tyrosine phosphorylation in GCs.

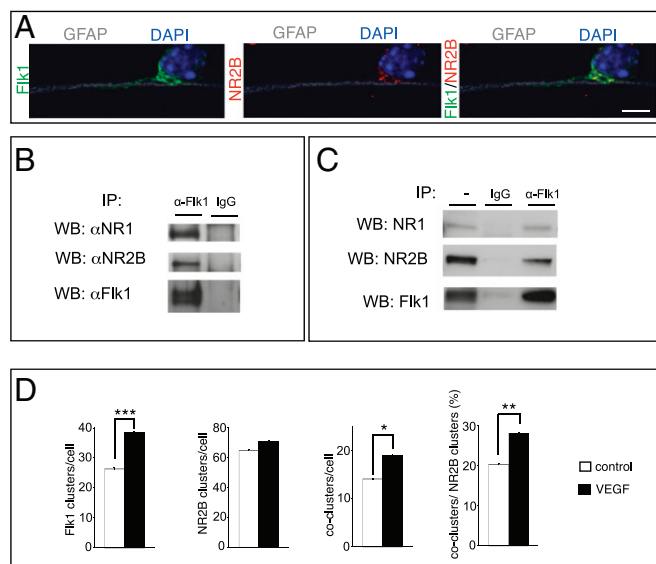
To facilitate further molecular mapping of this pathway, we used cotransfected HEK-293 cells because this cellular model exhibits the same VEGF-induced effect on NMDARs as GCs (as described above). As expected, VEGF activated Flk1 signaling, revealed by increased phosphorylation of Flk1-Tyr<sup>1173</sup> (Fig. 3C). VEGF also increased the phosphorylation of Flk1-Tyr<sup>949</sup>, acting as a docking site for SFKs (34, 35) (Fig. 3C). Immunoblotting for  $\alpha$ Src-pTyr<sup>416</sup> showed that VEGF activated SFKs (Fig. 3D and Fig. S6B). Finally, VEGF also increased tyrosine phosphorylation of NR2B (Fig. 3E). This phenomenon was also observed when VEGF was used in combination with NMDA (Fig. S6A).

We next analyzed whether the increase in NR2B phosphorylation by VEGF relied on SFKs. We therefore coexpressed NR1, NR2B, and Flk1 together with an active form of Src (Src<sup>WT</sup>) or a dominant-negative mutant form of Src (Src<sup>DN</sup>) in which the kinase domain was inactivated (K295R) and the regulatory domain was mutated (Y527F); this dominant-negative Src<sup>DN</sup> is well known to block SFKs (36, 37). Src<sup>DN</sup> abrogated the increase in NR2B tyrosine phosphorylation by VEGF (Fig. 3F and Fig. S6A and B). We also used a NR2B mutant (NR2BTM) in which the tyrosine residues that become phosphorylated by SFKs are mutated to phenylalanines and are no longer phosphorylated (15). Coexpression of Flk1, NR1, and NR2BTM abolished VEGF-induced NR2B phosphorylation (Fig. 3G). Thus, activation of Flk1 by VEGF stimulated SFK-dependent tyrosine phosphorylation of NR2B.

**VEGF Enhances NMDAR-Mediated  $[Ca^{2+}]_i$  and Currents via SFKs.** To link the VEGF-induced phosphorylation of NR2B to the increased NMDAR-mediated  $[Ca^{2+}]_i$  by VEGF, we measured the  $[Ca^{2+}]_i$  in HEK-293 cells cotransfected with Flk1, NR1, and either NR2B or NR2BTM. Compared with controls, cells expressing NR2BTM did not exhibit the VEGF-dependent amplification of the NMDA-induced  $[Ca^{2+}]_i$  (Fig. 3H). Furthermore, to demonstrate an involvement of SFKs, we blocked the SFK activity in electrophysiological measurements directly in the recorded GCs by administering the SFK inhibitor PP1 via the patch pipette using previously described methods (38). SFK blockade abolished the amplification of the NMDAR-mediated currents by VEGF in GCs, whereas the inactive homolog PP3 was ineffective (Fig. 3I and Fig. S7A and B). Calcium imaging studies in GCs confirmed that PP1, but not PP3, abrogated the potentiation by VEGF of the  $[Ca^{2+}]_i$  transients in response to NMDA (Fig. 3J and Fig. S7C and D). Thus, VEGF-dependent activation of SFKs enhances NMDAR currents and  $[Ca^{2+}]_i$  via tyrosine phosphorylation of NR2B.

**VEGF Promotes GC Migration via NMDAR Activation.** We recently reported that VEGF attracts GCs during cerebellar development (2). To explore the physiological relevance of the VEGF/NMDAR link in this process, we used a modified Boyden chamber assay (39) and counted GCs migrating to the lower side of the filter. When VEGF was added to the lower compartment, GC migration was enhanced, indicating that VEGF is chemotactic for GCs (Fig. 4A and Fig. S8A). Addition of D-APV to the upper chamber did not affect GC motility, suggesting that endogenous glutamate, released by GCs (40), could not activate NMDAR in these conditions (Fig. 4A). However, when added together with VEGF, D-APV reduced the chemotactic GC response to VEGF (Fig. 4A), implying that the effect of VEGF relies on NMDAR activation. These data suggest a model whereby VEGF sensitized NMDAR to the low levels of endogenous glutamate and thereby stimulated GC migration.

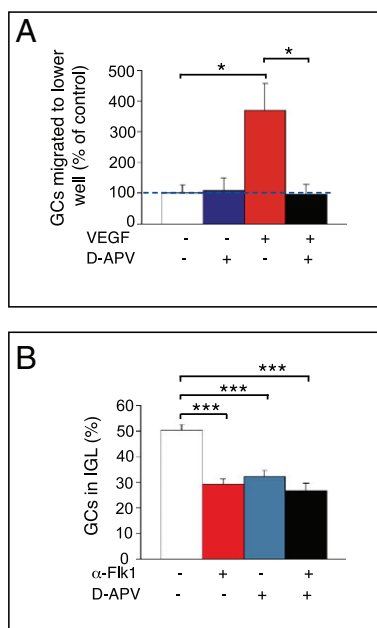
To further underscore the relevance of the VEGF/NMDAR link for GC migration in a more in vivo-like microenvironment,



**Fig. 2.** Flk1 associates with NR1 and NR2B. (A) Confocal image of a GC migrating along a glia fiber (GFAP<sup>+</sup>; gray/white), showing Flk1 (green) and NR2B (red) expression at the plasma membrane; counterstaining is DAPI (blue). (B and C) Lysates of GCs (B) or cotransfected HEK-293 cells (C) were immunoprecipitated with an anti-Flk1 antibody (α-Flk1) or with a control IgG and immunoblotted for NR1 (top lane), NR2B (middle lane), or Flk1 (bottom lane). (D) Quantification of Flk1 or NR2B clusters and of Flk1/NR2B coclusters at the GC surface, revealing that VEGF stimulation did not affect the number of NR2B clusters ( $n = 54–46$ ,  $P =$  not significant) but increased the number of Flk1 clusters ( $n = 54–46$ ,  $***P < 0.001$ ) and Flk1/NR2B coclusters ( $n = 54–46$ ,  $*P < 0.05$  for coclusters per cell;  $**P = 0.005$  for percentage of coclusters/NR2B clusters). (Scale bar: A, 5  $\mu$ m.)







**Fig. 4.** VEGF-induced potentiation of NMDAR activity promotes GC migration. (A) Quantification of GC migration in Boyden chamber assay, showing that supplementation of D-APV (10  $\mu$ M) to the upper chamber (blue bar) does not affect GC motility compared with the control condition (white bar). When VEGF (50 ng/mL) is added to the lower chamber (red bar), GC migration is increased. This increase is inhibited by adding D-APV (10  $\mu$ M) in the upper chamber (black bar,  $*P < 0.05$ ). (B) Analysis of GC migration in organotypic cerebellar slices [expressed as percentage of BrdU $^{+}$  GCs in the IGL versus total number of BrdU $^{+}$  GCs in EGL, molecular layer (ML), and IGL], showing inhibition of GC migration upon  $\alpha$ Flk1 treatment (red bar) and upon D-APV treatment (blue bar). The combination of  $\alpha$ Flk1 and D-APV does not reduce GC migration further (black bar;  $***P < 0.001$ ).

phosphorylation and enhancement of NMDAR-mediated currents and  $[Ca^{2+}]_i$ .

The molecular pathways via which VEGF promotes neuronal migration and neurite outgrowth are largely unknown, in contrast to the wealth of information about the molecular signaling mechanisms of VEGF/Flk1 in endothelial cells (34). In these cells, binding of VEGF to Flk1 stimulates migration and vascular permeability in part via activation of SFKs (41). Our studies in GCs now show that VEGF also activates SFKs in these neurons and that SFKs transmit intermediary signals from Flk1 to NMDAR to enhance the conductance and  $[Ca^{2+}]_i$  of NMDAR channels. SFKs regulate NMDARs in part by preventing internalization of activated surface-exposed NMDARs as well as by regulating ion channel properties (32). In GCs in the absence of synapses, we also observed that VEGF increased the formation of cell surface Flk1/NR2B coclusters.

During postnatal cerebellar development, migrating GCs predominantly express the NR2B subunit (19), and, when blocked, GC migration is impaired (12). Further evidence that NMDARs regulate GC migration is provided by findings that GC migration is inhibited by NMDAR blockade and accelerated by enhanced NMDAR activity (11, 13). In a recent study, we documented that VEGF controls GC migration as a chemotactic guidance cue in the developing cerebellum *in vivo* (2). Using the Boyden chamber assay *in vitro* and the organotypic cerebellar slice model *ex vivo*, we now show that VEGF is chemotactic for GCs in a NMDAR-dependent manner. Because elevated  $Ca^{2+}$  levels in response to NMDAR activation promote filopodia formation, turning responses, and neuronal motility (8, 11, 42), amplification of NMDARs activity by VEGF would enhance neuronal migration. Because VEGF is present as a gradient in the developing cerebellum (2), sensitization of NMDARs by

VEGF to glutamate may explain why migrating GCs become progressively chemoattracted to the highest levels of VEGF in the deeper layers of the cerebellar cortex. The finding that activation of Flk1 and NMDAR together also stimulates chemokinesis (Fig. S8B) may further explain how VEGF regulates GC migration. Overall, this study provides unique molecular mechanistic insights in how VEGF regulates neuronal migration.

Previous studies documented that ephrin-b2 and neuregulin enhance the activity of NMDARs through SFK-dependent phosphorylation of particular NR2 subunits (15, 43). In contrast to our study, however, those reports documented regulation of synaptic NMDAR at the postsynaptic site and reported how these molecules amplified the activity of NMDAR in synaptogenesis, synaptic transmission, and plasticity. We show here that VEGF modulates the NMDAR activity during migration of immature GCs before they form synapses. Intriguingly, however, the VEGF/NMDAR link may not be restricted alone to NMDARs before synapse formation and be even of broader (patho)physiological relevance because hippocampal and motor neurons, known to express synaptic NMDARs (NMDARs), also express Flk1 (44, 45).

Overall, the role for VEGF as a modulator of NMDAR activity provides further evidence for the importance of the neurovascular link. Given the expression of VEGF and Flk1 in many cell types in the central nervous system (1, 46) as well as the general implication of NMDARs in numerous neurobiological processes in health and disease, these findings also raise intriguing questions about the possible role of this identified VEGF/NMDAR link in non-developmental processes, including learning, memory, synaptic plasticity, and neurodegeneration. It will be also necessary to further dissect the molecular details of how VEGF precisely influences the activity of NMDARs in providing neuroprotection versus excitotoxicity (47). Furthermore, defects in stimulating NMDAR phosphorylation by neuregulin has been implicated in the pathogenesis of schizophrenia (46, 48). More speculatively, it will be therefore interesting to examine whether defective stimulation of NMDAR phosphorylation by insufficient VEGF might also increase the susceptibility of neurons to dysfunction or degeneration. As for now, our findings of how an activity-independent signal (VEGF) regulates a receptor for a classic neurotransmitter provide a unique insight into the molecular basis of brain wiring.

## Materials and Methods

**GC Purification and Chemotaxis Assay.** GCs were purified as described in ref. 49.

**Immunohistochemistry.** Purified GCs were fixed in nonpermeable conditions and stained with antibodies recognizing extracellular epitopes of the corresponding proteins. Cerebellar slices were fixed for 2 h in 4% PFA at room temperature and subsequently processed for BrdU immunostaining.

**Analysis of Flk1 and NR2B Coclusters.** Analysis of Flk1 and NR2B coclusters was performed by using the image analysis software package Imaris (version 6.3.1) (Fig. S5). Clusters were detected in the maximum projection of 3D confocal z-stack images.

**Electrophysiological Recordings.** Whole-cell patch-clamp recordings were performed on acute parasagittal cerebellar slices (200–300  $\mu$ m thick) (2, 50) from P8 C57BL6 mice. GCs were characterized electrophysiologically by their absence of action potentials and synaptic events and by their high input resistance and small cell capacitance (29). NMDA (50  $\mu$ M; Tocris) was added to the perfusion solution, and VEGF (150 ng/mL; R&D Systems) was topically applied by pressure (Picospritzer II). NMDAR-mediated responses were blocked with D-APV (50  $\mu$ M; Tocris).

**Ex Vivo Cerebellar Electroporation.** Cerebella dissected from P8 or P10 mice were electroporated as previously described (2). See *SI Materials and Methods* for details of the used shRNAi constructs.

**Transfection of HEK-293 Cells.** The following plasmids were used for transfection: Flk1, NR1, NR2B-GFP (termed NR2B), NR2BTM, Src $^{WT}$ , Src $^{DN}$ , shFlk1 $^{KD}$ , and shFlk1 $^{CT}$ . For the phosphorylation experiments, cells were starved 1 d after transfection in 0.1% serum containing medium for 16–20 h.

**Calcium Imaging.** Cell cultures of primary GCs (1–1.5 DIV) or transfected HEK-293 cells were loaded with 5  $\mu$ M fura-2-acetoxymethyl ester plus 0.1% Pluronic F-127 (Molecular Probes) and incubated for 60 min in Hepes-buffered saline solution (HBSS). NMDA pulses and washes were performed with a perfusion system, and the rest of the incubations and treatments were performed without perfusion.

**Immunoprecipitation and Immunoblotting.** GCs or transfected HEK-293 cells were stimulated with VEGF (50 ng/mL) for 15 or 5 min, respectively, and lysed afterward. For immunoprecipitation, 400  $\mu$ g of protein extract was incubated overnight at 4  $^{\circ}$ C with the antibody of interest.

**Culture and Treatment of Organotypic Cerebellar Slices.** Cerebellar slices were cultured for 4 d as described previously (51). Slices were treated either with  $\alpha$ Flk1 (30  $\mu$ g/mL; ATCC), D-APV (25  $\mu$ M), or a combination of  $\alpha$ Flk1 plus D-APV by adding them to the culture medium.

**Statistics.** Unless specifically stated, data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed by applying a paired Student's *t* test.

Please see *SI Materials and Methods* for detailed experimental procedures.

- Ruiz de Almodovar C, Lambrecht D, Mazzone M, Carmeliet P (2009) Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol Rev* 89:607–648.
- Ruiz de Almodovar C, et al. (2010) Matrix-binding vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms guide granule cell migration in the cerebellum via VEGF receptor Flk1. *J Neurosci* 30:15052–15066.
- Lau CG, Zukin RS (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8:413–426.
- Newpher TM, Ehlers MD (2008) Glutamate receptor dynamics in dendritic microdomains. *Neuron* 58:472–497.
- Papadia S, Hardingham GE (2007) The dichotomy of NMDA receptor signaling. *Neuroscientist* 13:572–579.
- Luk KC, Sadikot AF (2004) Glutamate and regulation of proliferation in the developing mammalian telencephalon. *Dev Neurosci* 26:218–228.
- Platel JC, et al. (2010) NMDA receptors activated by subventricular zone astrocytic glutamate are critical for neuroblast survival prior to entering a synaptic network. *Neuron* 65:859–872.
- Lau PM, Zucker RS, Bentley D (1999) Induction of filopodia by direct local elevation of intracellular calcium ion concentration. *J Cell Biol* 145:1265–1275.
- Zheng JQ, Wan JJ, Poo MM (1996) Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient. *J Neurosci* 16:1140–1149.
- Behar TN, et al. (1999) Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. *J Neurosci* 19:4449–4461.
- Komuro H, Rakic P (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260:95–97.
- Mancini JD, Atchison WD (2007) The NR2B subunit in NMDA receptors is functionally important during cerebellar granule cell migration. *Neurosci Lett* 429:87–90.
- Tárnok K, Czöndör K, Jelítkai M, Czírok A, Schlett K (2008) NMDA receptor NR2B subunit over-expression increases cerebellar granule cell migratory activity. *J Neurochem* 104:818–829.
- Dalva MB, et al. (2000) EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* 103:945–956.
- Takasu MA, Dalva MB, Zigmund RE, Greenberg ME (2002) Modulation of NMDA receptor-dependent calcium influx and gene expression through EphB receptors. *Science* 295:491–495.
- Chen BS, Roche KW (2009) Growth factor-dependent trafficking of cerebellar NMDA receptors via protein kinase B/Akt phosphorylation of NR2C. *Neuron* 62:471–478.
- Cameron HA, McEwen BS, Gould E (1995) Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci* 15:4687–4692.
- d'Aldin CG, Ruel J, Assié R, Pujol R, Puel JL (1997) Implication of NMDA type glutamate receptors in neural regeneration and neofunction of synapses after excitotoxic injury in the guinea pig cochlea. *Int J Dev Neurosci* 15:619–629.
- Watanabe M, Mishina M, Inoue Y (1994) Distinct spatiotemporal expressions of five NMDA receptor channel subunit mRNAs in the cerebellum. *J Comp Neurol* 343:513–519.
- Rossi DJ, Slater NT (1993) The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration. *Neuropharmacology* 32:1239–1248.
- Hámori J, Somogyi J (1983) Differentiation of cerebellar mossy fiber synapses in the rat: A quantitative electron microscope study. *J Comp Neurol* 220:365–377.
- Manzini MC, Ward MS, Zhang Q, Lieberman MD, Mason CA (2006) The stop signal revised: Immature cerebellar granule neurons in the external germinal layer arrest pontine mossy fiber growth. *J Neurosci* 26:6040–6051.
- Losi G, Prybylowski K, Fu Z, Luo JH, Vicini S (2002) Silent synapses in developing cerebellar granule neurons. *J Neurophysiol* 87:1263–1270.
- Kim BW, et al. (2008) Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling regulates hippocampal neurons by elevation of intracellular calcium and activation of calcium/calmodulin protein kinase II and mammalian target of rapamycin. *Cell Signal* 20:714–725.
- Dawson NS, Zawieja DC, Wu MH, Granger HJ (2006) Signaling pathways mediating VEGF165-induced calcium transients and membrane depolarization in human endothelial cells. *FASEB J* 20:991–993.
- Cheng HW, James AF, Foster RR, Hancox JC, Bates DO (2006) VEGF activates receptor-operated cation channels in human microvascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1768–1776.
- Faehling M, Koch ED, Raithel J, Trischler G, Waltenberger J (2001) Vascular endothelial growth factor-A activates  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels in human endothelial cells in culture. *Int J Biochem Cell Biol* 33:337–346.
- Bocci G, et al. (2004) Increased plasma vascular endothelial growth factor (VEGF) as a surrogate marker for optimal therapeutic dosing of VEGF receptor-2 monoclonal antibodies. *Cancer Res* 64:6616–6625.
- Farrant M, Feldmeyer D, Takahashi T, Cull-Candy SG (1994) NMDA-receptor channel diversity in the developing cerebellum. *Nature* 368:335–339.
- Wang YT, Salter MW (1994) Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases. *Nature* 369:233–235.
- Köhr G, Seeburg PH (1996) Subtype-specific regulation of recombinant NMDA receptor-channels by protein tyrosine kinases of the src family. *J Physiol* 492:445–452.
- Salter MW, Kalia LV (2004) Src kinases: A hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci* 5:317–328.
- Zhang S, Edelmann L, Liu J, Crandall JE, Morabito MA (2008) Cdk5 regulates the phosphorylation of tyrosine 1472 NR2B and the surface expression of NMDA receptors. *J Neurosci* 28:415–424.
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L (2006) VEGF receptor signalling – in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:359–371.
- Matsumoto T, et al. (2005) VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis. *EMBO J* 24:2342–2353.
- Courter DL, Lomas L, Scatena M, Giachelli CM (2005) Src kinase activity is required for integrin  $\alpha_v\beta_3$ -mediated activation of nuclear factor- $\kappa$ B. *J Biol Chem* 280:12145–12151.
- Mukhopadhyay D, et al. (1995) Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature* 375:577–581.
- Wirkner K, et al. (2007) Modulation of NMDA receptor current in layer V pyramidal neurons of the rat prefrontal cortex by P2Y receptor activation. *Cereb Cortex* 17:621–631.
- Chédotal A (2010) Should I stay or should I go? Becoming a granule cell. *Trends Neurosci* 33:163–172.
- Gallo V, Ciotti MT, Coletti A, Aloisi F, Levi G (1982) Selective release of glutamate from cerebellar granule cells differentiating in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7919–7923.
- Eliceiri BP, et al. (1999) Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 4:915–924.
- Zheng JQ, Poo MM (2007) Calcium signaling in neuronal motility. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:375–404.
- Bjarnadottir M, et al. (2007) Neuregulin1 (NRG1) signaling through Fyn modulates NMDA receptor phosphorylation: Differential synaptic function in NRG1<sup>+/−</sup> knock-outs compared with wild-type mice. *J Neurosci* 27:4519–4529.
- Oosthuysen B, et al. (2001) Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet* 28:131–138.
- Yang SZ, Zhang LM, Huang YL, Sun FY (2003) Distribution of Flk-1 and Flt-1 receptors in neonatal and adult rat brains. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 274:851–856.
- Fulzele S, Pillai A (2009) Decreased VEGF mRNA expression in the dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenia subjects. *Schizophr Res* 115:372–373.
- Hardingham GE, Bading H (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: Implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 11:682–696.
- Stefansson H, Steinthorsdottir V, Thorgerirsson TE, Gulcher JR, Stefansson K (2004) Neuregulin 1 and schizophrenia. *Ann Med* 36:62–71.
- Hatten ME (1985) Neuronal regulation of astroglial morphology and proliferation in vitro. *J Cell Biol* 100:384–396.
- Salin PA, Malenka RC, Nicoll RA (1996) Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses. *Neuron* 16:797–803.
- Renaud J, et al. (2008) Plexin-A2 and its ligand, Sema6A, control nucleus-centrosome coupling in migrating granule cells. *Nat Neurosci* 11:440–449.



# Supporting Information

Meissirel et al. 10.1073/pnas.1100341108

## SI Materials and Methods

**Animals.** Swiss or C57BL/6J [postnatal days 5–6 (P5–P6)] mice were used for granule cell (GC) purification. Wistar rat pups (P8) were also used for immunostainings. All animals were treated according to the guidelines approved by the French Ethical Committee (agreement no. 693880201) and the Animal Care Committee of the University of Leuven, Leuven, Belgium.

**GC Purification and Chemotaxis Assay.** GCs were purified as described in ref. 3. Purified GCs were resuspended in serum-free DMEM supplemented with N2 and B27 (Gibco; Invitrogen). The in vitro migration of GCs was assessed by using polyvinyl carbonate-free membranes (8- $\mu$ m pore size), coated with laminin (20  $\mu$ g/mL; Sigma), in modified Boyden chambers as described (4). Briefly, 100  $\mu$ L of a solution containing  $1 \times 10^5$  cells in serum-free DMEM was placed in the upper chamber. VEGF (50 ng/mL), D-2-amino-5-phosphono-valerate (D-APV, 100  $\mu$ M; Tocris) or NMDA (10  $\mu$ M) was added alone or in combination in serum-free DMEM (supplemented with N2 and B27) in the lower or upper chamber, respectively. After overnight incubation, the upper surface of the membranes was scraped free of cells and debris and membranes were rinsed, fixed, stained for  $\beta$ III-tubulin, and counterstained with DAPI. GCs that had migrated through the pores and adhered to the membrane were analyzed by high-power fluorescent microscopy and counted in 30 nonadjacent high-power fields. Experiments were performed in duplicate. GCs at the lower side of the filter in treated conditions were expressed as a percentage of those in control conditions. Statistical significance was analyzed by one-way ANOVA followed by post hoc testing with correction of the *P* values for the number of tests performed.

**Immunohistochemistry. Cerebellar slices.** P10 mice were injected i.p. with BrdU (50 mg/kg of body weight); 3 h later, cerebellar slices (350  $\mu$ m) were made and cultured for 4 d in vitro (DIV). Subsequently, slices were fixed in 2% PFA/30% sucrose for 2 h at room temperature before BrdU immunostaining with an anti-BrdU (OBT 0030S Harlan; Oxford Biotechnology) antibody, followed by incubation with an Alexa Fluor 568-conjugated secondary antibody (Molecular Probes).

**Isolated GCs.** Purified GCs plated on poly-L-lysine and laminin-coated coverslips were fixed for 4 min with 4% PFA and 4% sucrose in PBS without detergent to avoid permeabilization, washed with PBS, and then blocked with 1% BSA in PBS for 1 h at room temperature. Surface receptors were stained overnight at 4 °C in 1% BSA in PBS with antibodies recognizing extracellular epitopes of the corresponding proteins (anti-NR2B, 1/12.5; Zymed Laboratories; and anti-Flk1, 1/25, clone AF644; R&D Systems). Coverslips were subsequently incubated with fluorescently conjugated secondary antibodies: Alexa Fluor 568 for Flk1, and Alexa Fluor 633 for NR2B. After staining, cells were fixed with 4% PFA, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS. After blocking, they were stained with anti- $\beta$ -III tubulin (1/200; Sigma) and Alexa Fluor 488. Finally, stained GCs were counterstained with DAPI by mounting the coverslips with ProLong Gold plus DAPI (Invitrogen).

**Ex Vivo Cerebellar Electroporation.** Cerebella dissected from P6, P8, or P10 WT pups were injected with 4–8  $\mu$ L of the DNA of interest (3  $\mu$ g/ $\mu$ L; EndoFree, GFP-expression vector in 5:1 ratio) into the superficial layers of the cerebellum. The following shRNAi constructs were used for Flk1 (Flk1<sup>KD</sup>) and for the control

(Flk1<sup>Ctrl</sup>): pENTR-U6-shFlk-KD: 5'-CACCGGAGAAATCGCTC-AGTGATGTTCTCTTGAACATCACTGAGCGATTTCTCC-3'; and pENTR-U6-shFlk-Ctrl: 5'-CACCGGAGTATCCCCCG-ACACATCTTCTCTTGAAGATGTGTGCG-GGGGATACTC-C-3'. The DNA of interest was diluted in PBS together with 0.2% Fast Green (Sigma). The cerebellum was subjected to five electric pulses of 85 V, 50 ms, and a 1.0-s delay between pulses by using 10-mm electrodes connected to a square pulse ECM 830 ElectroSquarePorator (BTX Harvard Apparatus). Meninges were removed, and 350- $\mu$ m slices were made with a tissue chopper (McIlwain). Slices were incubated in Millicells (Millipore) at 35 °C, 5% CO<sub>2</sub> and in medium containing 94.5% basal medium Eagle (Gibco), 1% glucose, 0.5% BSA, 1% penicillin/streptavidin (Gibco), and 1% supplement insulin/transferrin/selenium (Sigma).

**Culture and Treatment of Cerebellar Slices.** Cerebellar slices were cultured for 3–4 d as described previously (5). Slices for GC migration analysis were treated with anti-Flk1 blocking antibody ( $\alpha$ Flk1; 30  $\mu$ g/mL), D-APV (25  $\mu$ M), or a combination of  $\alpha$ Flk1 (30  $\mu$ g/mL) plus D-APV (25  $\mu$ M) by adding them to the culture medium. Half of the medium was refreshed every day with new inhibitors.

**Analysis of Flk1 and NR2B Coclusters.** Purified GCs (1 DIV) were stimulated with VEGF (50 ng/mL) for 10 min, fixed in non-permeabilized conditions, and immunostained for Flk1, NR2B, and  $\beta$ III-tubulin as described above. Imaging of GCs was performed with an LSM 710 laser scanning microscope (Zeiss) equipped with 34 spectral reflection/fluorescence detection channels and five laser lines (458, 488, 514, 543, and 633 nm). GCs were imaged with a Plan-Apochromat 100 $\times$ /1.40 oil differential interference contrast M27 objective. The laser scanning microscopy imaging software ZEN (version 2009) was used for digital acquisition and processing of the images. An average of 4 frames per image and a scan speed of 7 frames per s were used for acquisition. The indicated laser beams were used for DAPI (405 nm), Flk1 (543 nm), NR2B (633 nm), and  $\beta$ III-tubulin (488 nm). Stacks of confocal optical slices were collected digitally, and 3D reconstructions of image data were generated with the ZEN (version 2009) software package. Analysis of Flk1 and NR2B coclusters was performed by using the image analysis software package Imaris (version 6.3.1) (Fig. S5). Clusters were detected in the maximum projection of 3D confocal z-stack images by using a customized algorithm in which, for each fluorescent channel, a cluster was defined by an estimated diameter (between 0.04 and 0.1  $\mu$ m) and by a threshold of mean fluorescence intensity (after subtraction of the background signal). Coclusters were identified by generating a colocalization channel and applying the same fluorescence intensity threshold and estimated diameter used for identifying single clusters (Fig. S5). The statistical analysis of the number of clusters and coclusters per cell was performed by calculating the estimated marginal mean and the SEM of the absolute values by a general linear model (univariate ANOVA) while correcting for the experiment (*n* = 3 independent experiments). We used SPSS 16.0 to perform all statistical analyses.

**Electrophysiological Recordings.** Whole-cell patch-clamp recordings were performed on acute parasagittal cerebellar slices from P8 to P9 C57BL6 mice and on organotypic parasagittal cerebellar slices from P6 C57BL6 mice cultured for 3 DIV. Briefly,

cerebella were removed, placed in cooled saline (2–4 °C), and sectioned with a Vibratome (VT1000S; Leica) into 250- $\mu$ m-thick slices (6). The saline solution used for slicing contained 85 mM NaCl, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM glucose, and 75 mM sucrose. Slices were maintained at room temperature for up to 6 h in the incubation solution equilibrated with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Whole-cell patch-clamp recordings from GCs in the lower external GC layer (EGL) were performed in acute or electroporated slices with an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments) under visual control using an upright microscope equipped with infrared light and fluorescence (BX50WI; Olympus). GCs in the lower EGL were identified visually under Nomarski differential interference contrast optics and, for EGFP<sup>+</sup> GCs, with a filter set for a 488 fluorophore. Internal recording solution contained 120 mM Cs-gluconate, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM phosphocreatine, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 mM Na-ATP, 0.4 mM GTP, and 10 mM Hepes (300 mOsm at pH 7.2). Neurobiotin (0.5–1%) was routinely added to the internal recording solution to allow post hoc morphological identification of the recorded cells. The typical pipette resistance was ~8 M $\Omega$  for GCs. GCs were characterized electrophysiologically by their absence of action potentials and synaptic events as well as by their high input resistance ( $5.9 \pm 0.8$  G $\Omega$ ) and small cell capacitance (7). The perfusion solution contained 124 mM NaCl, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, and 10 mM glucose with 0.5  $\mu$ M strychnine hydrochloride (Sigma) and 100  $\mu$ M glycine (Sigma). To record NMDAR-mediated currents in GCs, 10, 25, or 50  $\mu$ M NMDA (Tocris) was added to the perfusion solution, and VEGF (150 ng/mL; R&D Systems) was applied locally with a 2- $\mu$ m-diameter micropipette above the recorded GC (~15  $\mu$ m) by pressure (0.5 bar; Picospritzer II) during 50 ms at a frequency from 0.1 to 0.5 Hz. VEGF was topically applied to minimize possible indirect effects. Control experiments with topical saline or PBS application revealed that the mechanical stimulus associated with this local administration route did not evoke any NMDAR-current (data not shown). NMDAR-mediated responses were blocked by using the selective NMDAR antagonist D-APV (Tocris) at 50  $\mu$ M. The small Src-family kinase (SFK) inhibitor PP1 (10  $\mu$ M) or its inactive homolog PP3 (10  $\mu$ M) was applied through the patch pipette to block SFK directly in the recorded cell. GCs were recorded in voltage-clamp mode, and a ramp of potential from –80 to +20 mV or –60 to +40 mV (100 mV·s<sup>–1</sup>) was applied. The current amplitudes were plotted against voltage, and the data were fitted by linear regression to generate a slope conductance and reversal potential. Online and offline data analysis were carried out with Acquis1 (G. Sadoc, Centre National de la Recherche Scientifique, French National Innovation Support Agency, France). A paired *t* test was applied for statistical analysis of electrophysiological experiments.

**Transfection of HEK-293 Cells.** HEK-293 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and transfected by using the calcium phosphate method or Lipofectamine (Invitrogen). The following plasmids were used for transfection: Flk1, NR1, NR2B-GFP (termed NR2B), shRNAi for Flk1 (Flk1<sup>KD</sup>), control shRNAi (Flk1<sup>Ctrl</sup>), NR2BTM, Src<sup>WT</sup>, and Src<sup>DN</sup> (mutations Y295R and Y527F). For HEK-293 cells expressing recombinant NMDARs, ketamine (500  $\mu$ M) was included in the media 16 h after transfection and washed out before VEGF stimulation. For the phosphorylation experiments, cells were starved 1 d after transfection in 0.1% serum containing medium with ketamine for 16–20 h. Afterward, GCs and HEK-293 cells were stimulated with VEGF (50 ng/mL) for 5 or 15 min, as indicated. For testing the effect of a combined NMDA plus VEGF stimulus (Fig. S2), cells were stimulated with NMDA (3  $\mu$ M) or control medium for

10 min and subsequently incubated with VEGF (50 ng/mL) for 30 min in the presence of NMDA or control medium.

**Calcium Imaging.** GCs were exposed to NMDA (30  $\mu$ M) for 7 min through a perfusion system, washed in Hepes-buffered saline solution (HBSS) for 10 min with a perfusion system, and then incubated (no perfusion) with VEGF (10 ng/mL) for 15 min. Thereafter, a second NMDA [ $\pm$  D-APV (100  $\mu$ M)] pulse of 7 min was given. IgG (10  $\mu$ g/mL) and  $\alpha$ Flk1 (10  $\mu$ g/mL) were preincubated for 15 min (no perfusion) before adding VEGF (10 ng/mL) and incubating the cells for 15 min (no perfusion). GCs were incubated with PTK787 (PTK; 3  $\mu$ M; LCL Laboratories) or its control vehicle for 5 min (no perfusion), then washed (with HBSS) for 5 min with perfusion and incubated with VEGF (10 ng/mL) for 15 min with no perfusion before the second NMDA pulse. GCs were incubated with PP1 (3  $\mu$ M) and PP3 (3  $\mu$ M) for 10 min (no perfusion), washed (in HBSS) for 5 min with perfusion, and subsequently exposed to VEGF (10 ng/mL) for 15 min with no perfusion. HEK-293 cells were exposed to NMDA (30  $\mu$ M) for 5 min with perfusion, washed (with HBSS) for 10 min with perfusion, treated with VEGF (10 ng/mL) for 15 min with no perfusion, and thereafter exposed to a second pulse of NMDA (30  $\mu$ M) for 5 min with perfusion. Fura-2 (excitation: 340 and 380 nm; emission: 510 nm) ratio images were acquired with a CCD camera (Princeton Instrument) and digitized (256  $\times$  512 pixels) with MetaFluor 6.2r6 software (Universal Imaging Corporation).  $\Delta$ Ca<sup>2+</sup> was calculated as the difference between the maximum Ca<sup>2+</sup> influx ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) during NMDA stimulation and basal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

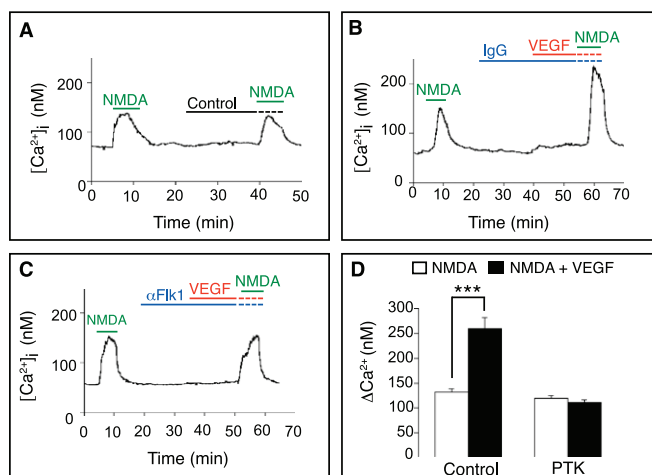
**Immunoprecipitation and Immunoblotting.** GCs or transfected HEK-293 cells, stimulated with VEGF (50 ng/mL) for 15 or 5 min, respectively, were lysed in lysis buffer [for HEK-293 cells: 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM EDTA, and 1% Nonidet P-40 complemented with proteinase and phosphatase inhibitors (Roche); for GCs: lysis buffer 9803 from Cell Signaling complemented with proteinase and phosphatase inhibitors (Roche)]. For immunoprecipitation, 400  $\mu$ g of protein extract was incubated overnight at 4 °C with the antibody of interest. The mixtures were then incubated with protein G (GE Healthcare) or protein A/G Sepharose beads (Pierce) for 2 h at 4 °C. Sepharose beads were washed two times with 1% Nonidet P-40 buffer, one time with Tris-HCl buffer (20 mM Tris-HCl/150 mM NaCl, pH 7.5), and boiled in sample buffer before being subjected to SDS/PAGE analysis. Lysates were also separated on SDS/PAGE gels. SDS/PAGE gels were transferred on nitrocellulose membranes and immunoblotted. The following antibodies were used. For immunoprecipitation, mouse anti-Flk1 (recognizing the extracellular domain, AF644, 1/1,000; R&D Systems), mouse anti-NR2B (610416, 1/250; BD Biosciences), anti-phosphotyrosine PY99 (7020, 1/200; Santa Cruz Biotechnology), and mouse anti-phosphotyrosine 4G10 (1/100; Upstate) were used. As controls, mouse IgGs (Sigma) and rabbit IgGs (Sigma) were used. For immunoblotting, rabbit anti-Flk1 (recognizing the intracellular domain, 504, 1/200; Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-Flk1 (recognizing the extracellular domain, AF644, 1/1,000; R&D Systems), mouse anti-Flk1 (6251, 1/100; Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-Flk1 (315, 1/100; Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-phospho-Flk1 Tyr<sup>951</sup> (antibody against human Flk1 Tyr<sup>951</sup> that cross-reacts with mouse Flk1-Tyr<sup>949</sup> 4991, 1/1,000; Cell Signaling), rabbit anti-phospho-Flk1 Tyr<sup>1173</sup> (2478, 1/1,000; Cell Signaling), rabbit anti-Src (05-184, 1/1,000; Millipore or sc-18, 1/1,000; Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-phospho-Src Tyr<sup>416</sup> (2101, 1/1,000; Cell Signaling), mouse anti-NR2B (610416, 1/250; BD Biosciences), rabbit anti-NR2B (1557P, 1/1,000; Millipore), and mouse anti-NR1 (556308, 1/500; BD Biosciences) were used.

# Analysis of Flk1 and NR2B Cell Surface Expression in Growth Cones.

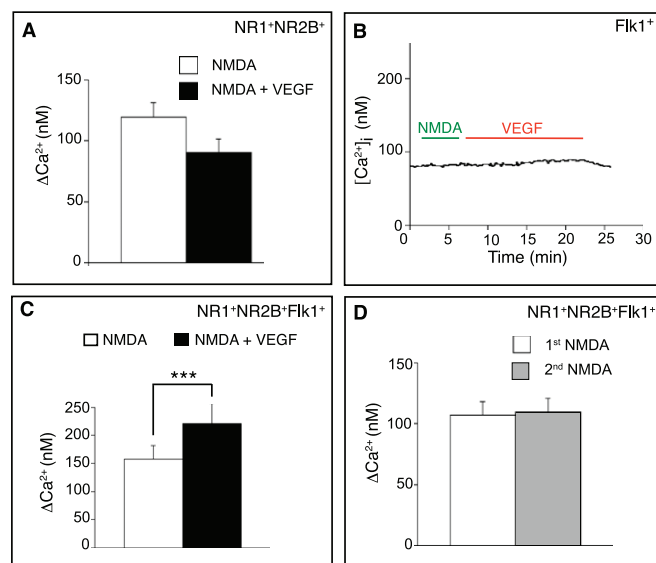
Heparin beads (H5263; Sigma) were extensively washed in PBS and soaked at room temperature for 4 h in PBS/BSA (0.5%), containing human VEGF<sup>165</sup> (50 mg/mL; R&D Systems) or control solution (0.5% PBS/BSA). After overnight incubation at 4 °C and subsequent rinses in PBS, control or VEGF-coated beads were inserted in plasma clots on poly-L-lysine/laminin-coated coverslips, onto which purified GCs were also plated and cultured in serum-free DMEM supplemented with N2 and B27. Plated GCs were then cultured in the presence of control or VEGF-coated beads for 16 h (to allow release of VEGF). Afterward, cultured GCs were fixed and processed for surface Flk1 and NR2B immunostaining as described above. Images of im-

munostained growth cones were acquired with an ApoTome microscope with a 63×/1.4 oil objective. Optical sections were imaged with an interval of 0.25  $\mu$ m. Stacks of optical slices were collected digitally, after which 3D reconstructions were generated by using the Image J software. The total surface Flk1 and NR2B fluorescent area was measured by using the Image J software, keeping the same fluorescence intensity thresholds for each condition; these areas were then divided by the area of the growth cone. Colocalization of Flk1 and NR2B was assessed by using Image J and the “intensity correlation analysis” plug-in, as previously described (8). The area of colocalized pixels was then normalized to the total Flk1 or NR2B surface fluorescence.

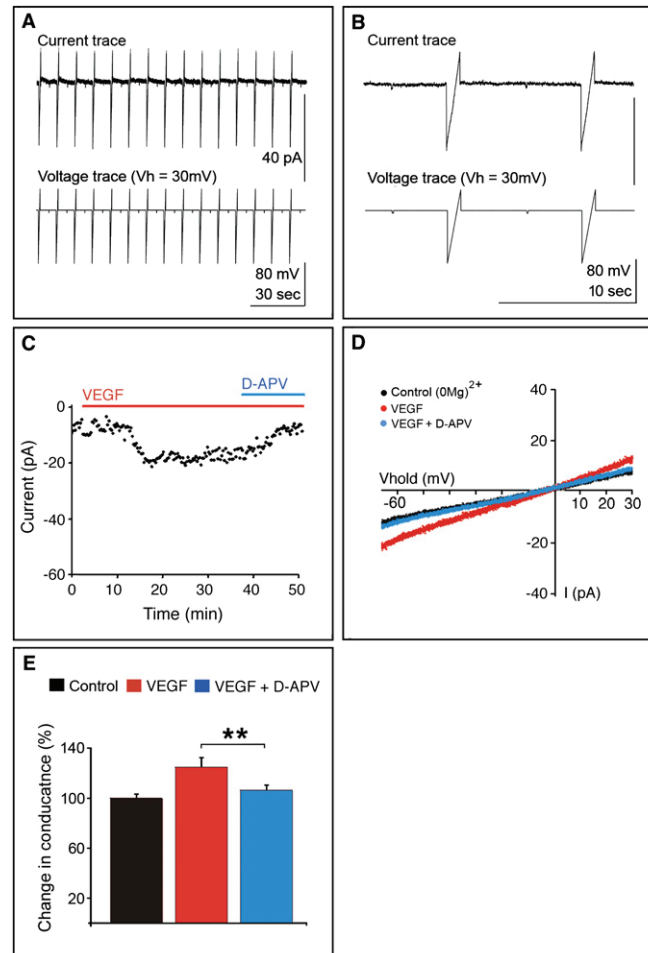
1. Wirkner K, et al. (2007) Modulation of NMDA receptor current in layer V pyramidal neurons of the rat prefrontal cortex by P2Y receptor activation. *Cereb Cortex* 17: 621–631.
2. Du XL, et al. (2004) Differential effects of tyrosine kinase inhibitors on volume-sensitive chloride current in human atrial myocytes: Evidence for dual regulation by Src and EGFR kinases. *J Gen Physiol* 123:427–439.
3. Hatten ME (1985) Neuronal regulation of astroglial morphology and proliferation in vitro. *J Cell Biol* 100:384–396.
4. Borghesani PR, et al. (2002) BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells. *Development* 129:1435–1442.
5. Renaud J, et al. (2008) Plexin-A2 and its ligand, Sema6A, control nucleus-centrosome coupling in migrating granule cells. *Nat Neurosci* 11:440–449.
6. Salin PA, Malenka RC, Nicoll RA (1996) Cyclic AMP mediates a presynaptic form of LTP at cerebellar parallel fiber synapses. *Neuron* 16:797–803.
7. Farrant M, Feldmeyer D, Takahashi T, Cull-Candy SG (1994) NMDA-receptor channel diversity in the developing cerebellum. *Nature* 368:335–339.
8. Li Q, et al. (2004) A syntaxin 1,  $G_{\alpha_o}$ , and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: Analysis by quantitative immunocolocalization. *J Neurosci* 24:4070–4081.



**Fig. S1.** VEGF enhances NMDA-stimulated  $[Ca^{2+}]_i$  via Flk1 in GCs. (A) Representative single GC tracing of intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  levels obtained by  $Ca^{2+}$  imaging. GCs were stimulated a first time with NMDA, thereafter exposed to control buffer, and stimulated a second time with NMDA, revealing that control vehicle did not amplify the second NMDA response. (B and C) Single GC tracing of  $[Ca^{2+}]_i$ , showing abrogation of the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  by  $\alpha$ Flk1 (C) but not by control IgG (B). (D) Measurements of  $\Delta Ca^{2+}$ , revealing inhibition of VEGF-dependent increase in  $[Ca^{2+}]_i$  by PTK but not by control vehicle ( $n = 164$ ,  $***P < 0.001$  for vehicle;  $n = 142$ ,  $P =$  not significant for PTK).

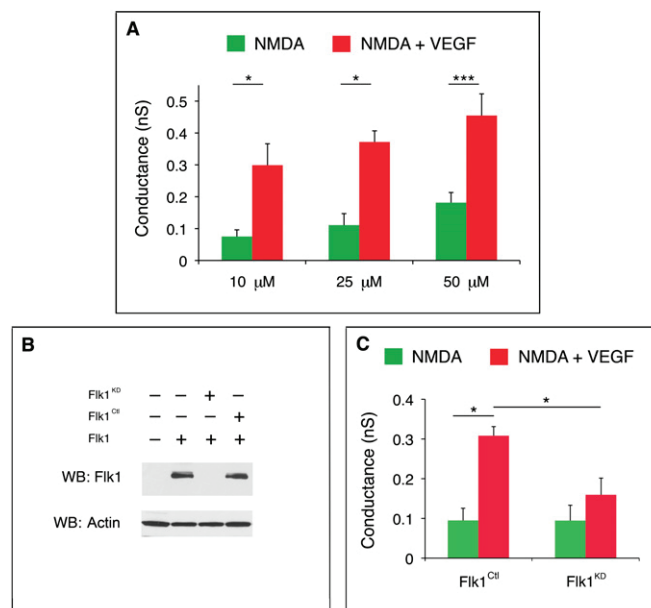


**Fig. S2.** VEGF potentiates NMDAR-mediated  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in HEK-293 cells. (A) Measurements of  $\Delta\text{Ca}^{2+}$  revealing lack of VEGF-induced potentiation in HEK-293 cells cotransfected only with NR1 and NR2B ( $n = 79$ ,  $P =$  not significant). (B) Representative  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  tracing of a single HEK-293 cell, transfected only with Flk1, revealing that VEGF itself did not elevate  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . (C and D) Measurements of  $\Delta\text{Ca}^{2+}$  in HEK-293 cells cotransfected with Flk1, NR1, and NR2B, showing that  $\Delta\text{Ca}^{2+}$  is increased by VEGF ( $n = 21$ ,  $***P < 0.001$ ; C) but not by control vehicle ( $n = 16$ ,  $P =$  not significant; D).

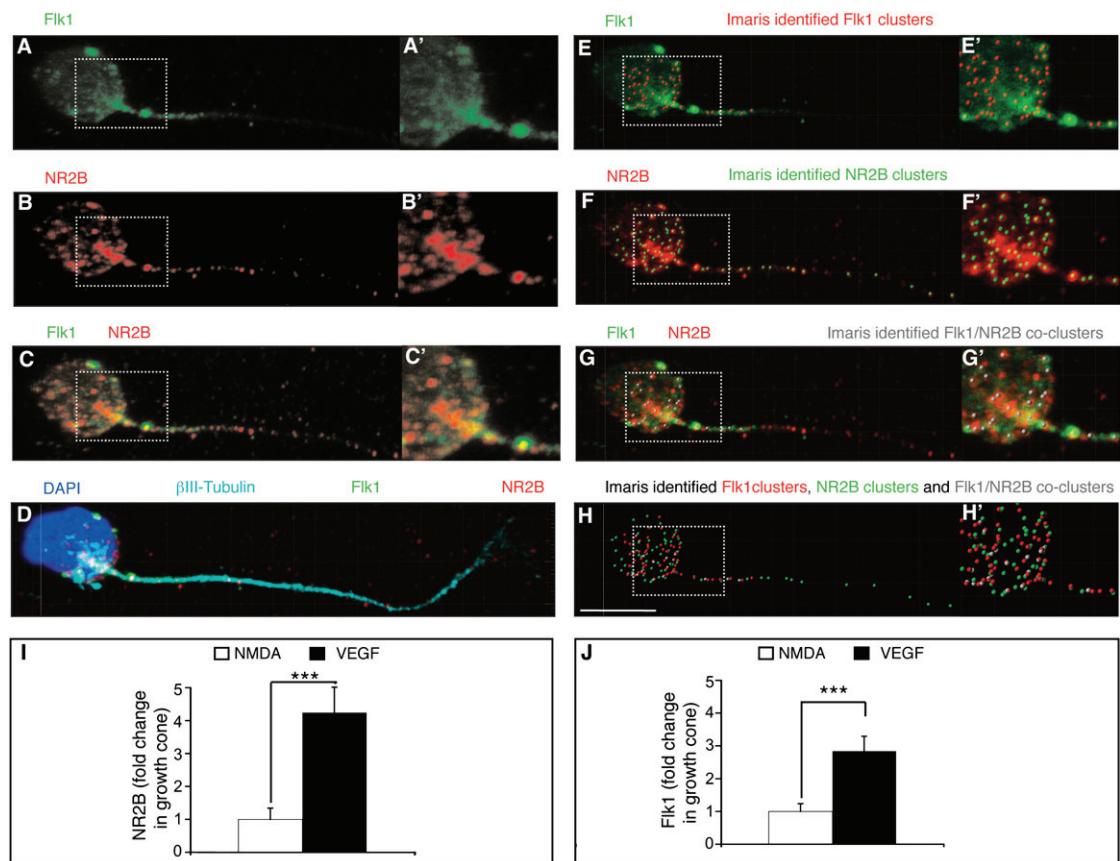


**Fig. 53.** VEGF induces small inward currents in GCs. (A) Representative current and voltage traces of a whole-cell patch-clamp recording of a GC in the lower EGL, showing no spontaneous synaptic events. (B) High magnification of the traces shown in A, illustrating the lack of synaptic events and the voltage ramp and square pulses. (C) Representative time course of whole-cell responses of a GC in the lower EGL, revealing a small inward current upon VEGF application, which was blocked by D-APV. (D) Current-voltage relationship of the responses of the GC shown in C, showing the inward current in response to VEGF alone, which was further blocked by D-APV. (E) Representation of the small changes in conductance after VEGF and VEGF + D-APV application, suggesting that most of the VEGF-induced current resulted from an amplification by VEGF of the NMDAR response to ambient glutamate in slices ( $n = 7$ ,  $**P < 0.01$ ).

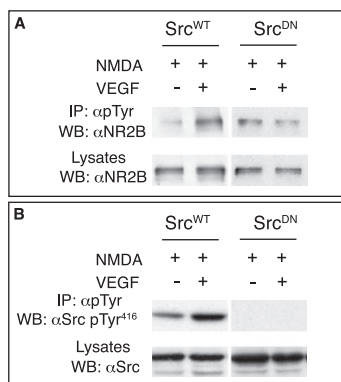




**Fig. S4.** Flk1 regulates VEGF-mediated potentiation of NMDAR currents in GCs. (A) VEGF potentiates NMDAR conductance induced at different concentrations of NMDA [ $n = 6, 7$ , and  $26$  at  $10, 25$ , and  $50 \mu\text{M}$  NMDA, respectively;  $*P < 0.05$  and  $***P < 0.001$  in VEGF + NMDA (red bars) versus NMDA (green bars)]. (B) Western blot showing down-regulation of Flk1 expression in HEK-293 cells cotransfected with Flk1 plus a shRNA construct for Flk1 (Flk1<sup>KD</sup>) but not in HEK-293 cells transfected with Flk1 alone or cotransfected with Flk1 plus a control shRNA (Flk1<sup>Ctrl</sup>). (C) Flk1<sup>Ctrl</sup> or Flk1<sup>KD</sup> constructs were coelectroporated with an EGFP expression vector in cerebella, and organotypic slices were cultured for 3 d before recording EGFP<sup>+</sup> GCs. Similar to results in acute slices, the NMDAR whole-cell patch-clamp conductance of EGFP<sup>+</sup>/Flk1<sup>Ctrl</sup> GCs in electroporated organotypic slices was increased after application of VEGF plus NMDA (red bar) compared with NMDA alone (green bar) ( $n = 5$ ,  $*P < 0.05$  in VEGF + NMDA versus NMDA for Flk1<sup>Ctrl</sup> GCs). In contrast, Flk1 silencing in EGFP<sup>+</sup>/Flk1<sup>KD</sup> GCs largely reduced the potentiating effect of VEGF on NMDAR-mediated currents ( $n = 5$ ;  $*P < 0.05$  for VEGF + NMDA in Flk1<sup>KD</sup> GCs versus VEGF + NMDA in Flk1<sup>Ctrl</sup> GCs;  $P =$  not significant for NMDA versus NMDA + VEGF in Flk1<sup>KD</sup> GCs).

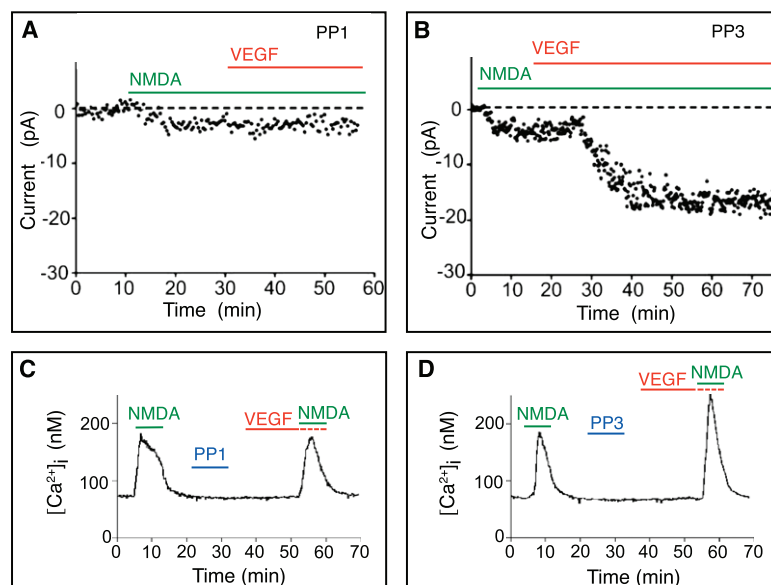


**Fig. S5.** VEGF induces coclustering of Flk1 and NR2B in GCs. (A–D) Maximum projection of 3D confocal z-stack images of a VEGF-treated GC immunostained for surface Flk1 (A, C, and D), NR2B (B–D), and  $\beta$ -III tubulin (D) and DAPI (D), revealing Flk1, NR2B, and Flk1/NR2B coclusters after VEGF stimulation. (E–G) Same images as in A–C, but now indicating the Imaris-detected clusters of Flk1 (red dots in E and G), NR2B (green dots in F and G), and Flk1/NR2B coclusters (white dots in G). (H) Representation of all Flk1 clusters (red dots), NR2B clusters (green dots), and Flk1/NR2B coclusters (white dots) identified by Imaris in the VEGF-treated GC shown in A–D. Insets A'–C' and E'–H' show a higher magnification of the area delineated by the white dashed box in the corresponding images. Clusters on the maximum projection of 3D confocal z-stack images were detected with the image analysis software package Imaris (version 6.3.1) by using a customized algorithm in which, for each fluorescent channel, a cluster was defined by an estimated diameter (between 0.04 and 0.1  $\mu$ m) and by a threshold of mean fluorescence intensity (after subtraction of the background signal). Coclusters were identified by generating a colocalization channel, applying the same fluorescence intensity threshold and estimated diameter used for identifying single clusters. Note that the images showing the clusters in E–H were also generated by maximum projection of 3D confocal z-stack images. (I and J) Quantification of the cell surface NR2B fluorescence (I) and Flk1 fluorescence (J) in GC growth cones, revealing that exposure to VEGF increased the cell surface levels of both NR2B and Flk1 ( $n = 25$ –19 for NR2B,  $***P < 0.001$ ;  $n = 25$ –19 for Flk1,  $***P < 0.001$ ). (Scale bar: A–H, 5  $\mu$ m.)

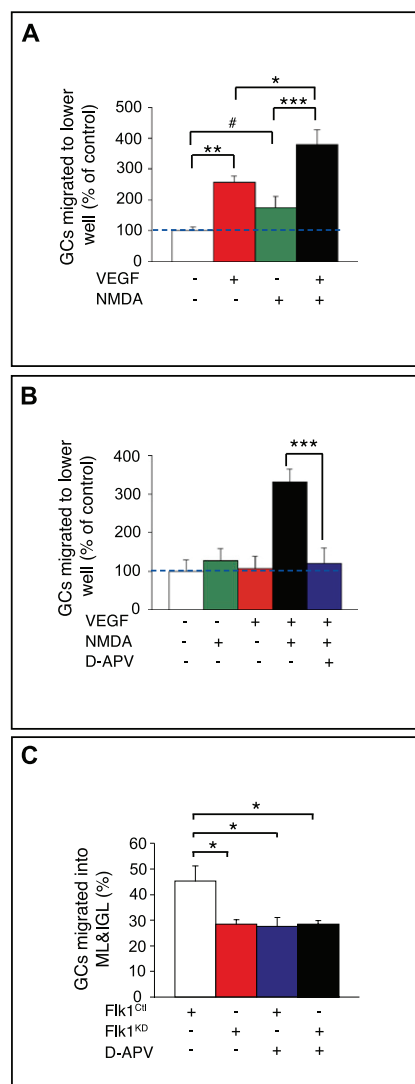


**Fig. S6.** VEGF induces NR2B phosphorylation via SFKs in the presence of NMDA. (A and B) HEK-293 cells were cotransfected with NR1, NR2B, Flk1, and Src<sup>WT</sup> or Src<sup>DN</sup>. At 24 h after transfection, cells were first stimulated with NMDA for 10 min and then stimulated with VEGF for 30 min in the presence of NMDA. Tyrosine phosphorylated proteins were immunoprecipitated with an anti-phosphorylated tyrosine ( $\alpha$ pTyr) antibody and then immunoblotted with an anti-NR2B antibody (A) or an antibody against SFK-pTyr<sup>416</sup> ( $\alpha$ SFK-pTyr<sup>416</sup>) (B), revealing that VEGF increased tyrosine phosphorylation of NR2B and Src in the presence of only Src<sup>WT</sup> but not Src<sup>DN</sup>. As loading controls, lysates were also immunoblotted for total NR2B (A) and Src ( $\alpha$ Src) (B).





**Fig. 57.** VEGF-mediated potentiation of NMDAR activity requires SFK in GCs. (A and B) Representative whole-cell patch-clamp recording of a GC in the lower EGL, revealing inhibition of the VEGF-stimulated increase in NMDAR-mediated current by PP1 (A) but not by its inactive analog PP3 (B). (C and D) Representative  $[Ca^{2+}]_i$  recording in a single GC, stimulated sequentially with NMDA, PP3 (D), or PP1 (C) for 10 min; with VEGF; and thereafter with NMDA, showing that PP1 blocked the VEGF-amplification of the NMDA response. Delivery of PP1 and PP3 was done as described by intracellular application in GCs in slices (1) or superfused in GC cultures (2).



**Fig. S8.** VEGF plus NMDA stimulates GC migration. (A and B) Boyden chamber assay, illustrating the stimulatory effect of VEGF on NMDAR-dependent motility. (A) When VEGF is added to the lower chamber (red bar), GC migration was stimulated compared with the control (white bar). In contrast, when NMDA (10  $\mu$ M) was added to the upper chamber (green bar), GC migration was not affected. The combination of VEGF in the lower chamber plus NMDA in the upper chamber increased GC migration (black bar) ( $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ ; #Not significant). (B) Neither VEGF (red bar) nor NMDA (green bar) stimulated GC motility when added alone in the upper chamber. In contrast, when both VEGF and NMDA were added to the upper chamber (black bar), the resulting potentiation of GC chemokinesis was blocked by D-APV ( $***P < 0.001$ ; blue bar), indicating that the effect of VEGF is mediated through NMDAR ( $n = 7$ ). (C) Analysis of GC migration in organotypic cerebellar slices [expressed as percentage of EGFP<sup>+</sup> GCs in the molecular layer (ML) and internal GC layer (IGL) versus total number of EGFP<sup>+</sup> GCs in EGL, ML, and IGL], showing inhibition of GC migration upon knockdown of Flk1 (Flk1<sup>KD</sup>, red bar) and upon blockage of NMDAR activity by D-APV treatment (blue bar). The combination of Flk1<sup>KD</sup> and D-APV did not reduce GC migration any further (black bar) ( $*P = 0.01$ ), indicating that VEGF regulates GC migration via the aforementioned VEGF/NMDAR modulation.

# Disrupted surface cross-talk between NMDA and Ephrin-B2 receptors in anti-NMDA encephalitis

Lenka Mikasova,<sup>1,2</sup> Pierre De Rossi,<sup>3,4</sup> Delphine Bouchet,<sup>1,2</sup> François Georges,<sup>1,2</sup> Véronique Rogemond,<sup>3,4,5</sup> Adrien Didelot,<sup>3,4,5</sup> Claire Meissirel,<sup>3,4</sup> Jérôme Honnorat<sup>3,4,5</sup> and Laurent Groc<sup>1,2</sup>

1 Interdisciplinary Institute for Neuroscience, Université de Bordeaux, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France

2 CNRS, IINS, F-33000 Bordeaux, France

3 Lyon Neuroscience Research Centre, INSERM U1028/CNRS UMR 5292, F-69372 Lyon, France

4 Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, F-69372 Lyon, France

5 Hospices Civils de Lyon, Hôpital Neurologique, Centre de Référence Maladie Rare 'Syndromes neurologiques Paraneoplasiques', F-69677 Bron, France

Correspondence to: Laurent Groc,  
CNRS, Interdisciplinary Institute for Neurosciences UMR 5297,  
Université de Bordeaux,  
146 rue Leo Saignat,  
Bordeaux 33077, France  
E-mail: laurent.groc@u-bordeaux2.fr

Autoimmune synaptic encephalitis are recently described human brain diseases leading to psychiatric and neurological syndromes through inappropriate brain–autoantibody interactions. The most frequent synaptic autoimmune encephalitis is associated with autoantibodies against extracellular domains of the glutamatergic N-methyl-D-aspartate receptor, with patients developing psychotic and neurological symptoms in an autoantibody titre-dependent manner. Although N-methyl-D-aspartate receptors are the primary target of these antibodies, the cellular and molecular pathway(s) that rapidly lead to N-methyl-D-aspartate receptor dysfunction remain poorly understood. In this report, we used a unique combination of high-resolution nanoparticle and bulk live imaging approaches to demonstrate that anti-N-methyl-D-aspartate receptor autoantibodies from patients with encephalitis strongly alter, in a time-dependent manner, the surface content and trafficking of GluN2-NMDA receptor subtypes. Autoantibodies laterally displaced surface GluN2A-NMDA receptors out of synapses and completely blocked synaptic plasticity. This loss of extrasynaptic and synaptic N-methyl-D-aspartate receptor is prevented both *in vitro* and *in vivo*, by the activation of EPHB2 receptors. Indeed, the anti-N-methyl-D-aspartate receptor autoantibodies weaken the interaction between the extracellular domains of the N-methyl-D-aspartate and Ephrin-B2 receptors. Together, we demonstrate that the anti-N-methyl-D-aspartate receptor autoantibodies from patients with encephalitis alter the dynamic retention of synaptic N-methyl-D-aspartate receptor through extracellular domain-dependent mechanism(s), shedding new light on the pathology of the neurological and psychiatric disorders observed in these patients and opening possible new therapeutic strategies.

**Keywords:** glutamate signalling; lateral diffusion; high-resolution nanoparticle imaging

**Abbreviations:** AMPAR = alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor; EPHB2R = Ephrin-B2 receptor; GABA =  $\gamma$ -aminobutyric acid; IgG = immunoglobulin G; NMDA = N-methyl-D-aspartate; SEP = super-ecliptic pHluorin

## Introduction

Autoimmune synaptic encephalitis are recently described human brain diseases leading to neurological and psychiatric syndromes through inappropriate brain–autoantibody interactions (Moscatto *et al.*, 2010; Vincent *et al.*, 2010; Lancaster *et al.*, 2011a). The worldwide description of these disorders has stimulated fruitful clinical and fundamental investigations, revealing multiple synaptic targets such as the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor (Dalmau *et al.*, 2007), the glutamate receptor GluA1 and GluA2 subunits of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA) (Lai *et al.*, 2009), the leucine-rich glioma-inactivated 1 protein (Lgi1) (Irani *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2010), the contactin-associated protein-like 2 (CASPR2) (Irani *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2010), the glycine receptor (Mas *et al.*, 2011), the B1 subunit of the  $\gamma$ -aminobutyric acid-B receptor (GABA<sub>B</sub>R) (Lancaster *et al.*, 2010) or the metabotropic glutamate receptor 5 (Lancaster *et al.*, 2011b). Among all of these targets, the most frequent synaptic autoimmune encephalitis is associated with autoantibodies against the NMDA receptor (Dalmau *et al.*, 2007, 2008, 2011; Chapman and Vause, 2011). Classically, patients first present psychiatric symptoms with paranoid and delusional thinking, perceptual disturbances, agitation, changes in speech, and bizarre behaviour and are possibly misdiagnosed with an acute psychotic break or drug abuse (Dalmau *et al.*, 2011). A few days later, patients deteriorate neurologically, with symptoms such as seizures, dyskinesia, altered levels of consciousness and autonomic and breathing instability. Despite the severity of neuropsychiatric symptoms, ~80% of patients fully recover after immunomodulatory treatments such as intravenous immunoglobulins, corticosteroids, cyclophosphamide or rituximab (Dalmau *et al.*, 2011). Some cognitive symptoms (disinhibition, poor attention, impulsivity) often persist several months after the acute phase of illness. Importantly, circulating NMDA receptor autoantibodies observed in the CSF and serum of these patients seem to play a direct role in the neurological syndromes. Indeed, a good clinical outcome is fully correlated with a significant decrease of NMDA receptor autoantibodies in patients' CSF (Dalmau *et al.*, 2008, 2011). The NMDA receptor autoantibodies decrease NMDA receptor cluster density in a manner that is reversible with the removal of the antibodies from neuronal cell cultures (Dalmau *et al.*, 2008; Hughes *et al.*, 2010). This effect is independent of the presence of complement, spares other synaptic proteins and does not affect excitatory synaptic density (Dalmau *et al.*, 2008; Hughes *et al.*, 2010). Furthermore, patients' CSF and purified immunoglobulins type G (IgGs) impaired glutamatergic transmission *in vivo* (Manto *et al.*, 2010). Thus, the anti-NMDA receptor autoantibodies present in patients with encephalitis could specifically act on surface NMDA receptors, in a reversible manner since immunotherapy leads to rapid recovery from neurological symptoms (Lee *et al.*, 2009; Dalmau *et al.*, 2011).

In this study, we took advantage of the identification and purification of these newly identified autoantibodies to acutely explore the cellular pathways activated during these neurological symptoms. The NMDA receptor autoantibodies are IgGs directed against extracellular epitopes of the GluN1 subunit

(Dalmau *et al.*, 2008, 2011). NMDA receptors are ionotropic glutamate receptors, structured as heteromeric channels comprising various combinations of GluN1, GluN2 and GluN3 subunits, which confer specific biophysical and pharmacological properties (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004). In hippocampus or cortex, the most abundant NMDA receptors are composed of GluN1 subunits associated with GluN2A (enriched in synapses) and/or GluN2B subunits (Wenthold *et al.*, 2003). NMDA receptors are trafficked to and from the plasma membrane through exocytosis and endocytosis, respectively (Petralia *et al.*, 2003), and their surface distribution and synaptic content is highly dependent on their lateral diffusion (Triller and Choquet, 2005). Recently, NMDA receptor synaptic content has been shown to be regulated by the expression level of the receptor tyrosine kinase EPHB2 (EPHB2R) and EPHB2R activation was shown to impact on NMDA receptor trafficking and synaptic targeting (Henderson *et al.*, 2001; Nolt *et al.*, 2011). EPHB2R directly associates with the NMDA receptor through the extracellular region of the GluN1 subunit (Dalva *et al.*, 2000) and this interaction plays an important role in regulating synaptic function.

To explore the dynamics of NMDA receptor subtypes in the presence of the autoantibodies and to shed light on the NMDA receptor-dependent synaptic regulation (Hughes *et al.*, 2010), we used a combination of high-resolution single particle and bulk imaging approaches in hippocampal neurons. Our data revealed that the presence of autoantibodies against NMDA receptors differentially alters the surface trafficking and distribution of GluN2-NMDA receptor subtypes, both in synapses and in extrasynaptic areas. The data further indicate that the interaction between NMDA receptors and EPHB2R is prevented by NMDA receptor autoantibodies and rescued by ephrin-B2 activation of EPHB2R. Identifying, at the single molecule level, the dysfunction of GluN2-NMDA receptor surface trafficking in a model of encephalitis clearly opens possibilities for new therapeutic strategies in broader neurological disorders involving NMDA receptor dysfunction.

## Materials and methods

### Patient cerebrospinal fluid and purified immunoglobulin G

CSF was obtained from different patients with typical encephalitis with antibodies to GluN1/GluN2 heteromers of the NMDA receptor (Table 1) (Dalmau *et al.*, 2008). In both cases, the CSF or serum were collected at symptom presentation, before any treatment and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  at NeuroBioTec (Biobank of the Hospices Civils de Lyon, France). The presence of anti-glutamate receptor NMDA receptor1 (NR1) antibodies was demonstrated as reported previously (Dalmau *et al.*, 2007). For control CSF and IgG, we selected a patient with an autoimmune disorder, paraneoplastic sensory neuronopathy (anti-Hu autoantibodies), and a patient without an autoimmune disorder but with dementia and brain tumour (Table 1). IgGs were purified (concentration 2 mg/ml) as previously described (Manto *et al.*, 2007) from the serum of different patients with encephalitis and NMDA receptor autoantibodies (Table 1). All samples were dialyzed against phosphate-buffered saline and solutions were used at pH 7.4.

**Table 1** Clinical features of the patients and controls used in the study

Patient ID	Age/sex	Symptoms	Cancer	Outcome
09-049 <sup>a</sup> (CSF)	4/M	Seizures, psychiatric symptoms, orofacial dyskinesia	No	Total recovery
09-030 (CSF)	11/F	Psychiatric symptoms, abnormal movements, seizures, dysautonomia	No	Psychiatric symptoms
09-052 (IgGs <sup>b</sup> )	24/F	Seizures, psychiatric symptoms, orofacial dyskinesias, severe dysautonomia	Ovary teratoma	No improvement; death
09-343 (IgGs <sup>b</sup> )	24/M	Psychiatric symptoms, abnormal movements, seizures, dysautonomia	No	Total recovery
09-667 (IgGs <sup>b</sup> )	22/F	Psychiatric symptoms, orofacial dyskinesia, seizures, dysautonomia	No	Total recovery
09-630 (IgGs <sup>b</sup> )	22/F	Psychiatric symptoms, orofacial dyskinesia, seizures	No	Psychiatric symptoms
09-007 (IgGs <sup>b</sup> )	32/F	Psychiatric symptoms, seizures, dysautonomia	Ovary teratoma	Total recovery
Controls				
SNP 793 (CSF; IgGs <sup>b</sup> )	58/M	Sensory neuronopathy with anti-Hu antibodies	Small cell lung carcinoma	Stable
10-450 (IgGs <sup>b</sup> )	68/F	Dementia	Brain tumour	Death

<sup>a</sup> Described in Lebas *et al.* (2010).

<sup>b</sup> IgGs purified from patient sera.

# Cell culture, immunocytochemistry, synaptic live staining and protein expression

Cultures of hippocampal neurons were prepared from embryonic Day 18 Sprague–Dawley rats. Cells were plated at a density of  $50 \times 10^3$  cells per ml on polylysine precoated cover-slips. Cover-slips were maintained in a 3% horse serum containing neurobasal medium. This medium was replaced after 4 days *in vitro* by a serum-free neurobasal medium. Cultures were maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for a maximum of 20 days *in vitro*. For immunostaining, surface endogenous GluN1 and EPHB2R were specifically stained in live neurons using polyclonal antibodies against GluN1 (1/300, Alomone labs, 15 min, 37°C) and EPHB2R (R&D systems, 1/200, 15 min, 37°C). Patient and control IgG were incubated for 2 h on live neurons at 37°C in culture medium. Neurons were then fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. To label postsynaptic areas, neurons were permeabilized using 0.1% Triton X-100, incubated with primary polyclonal antibodies against Shank (gift from Gundelfinger, 1/750, 45 min). Finally, neurons were incubated with secondary antibody anti-rabbit Alexa 568 antibodies (Invitrogen, 1/500, 45 min), anti-human Alexa 488 antibodies (Invitrogen, 1/500, 45 min) or anti-goat Alexa 488 antibodies (Invitrogen, 1/500, 45 min). Neurons were washed, mounted and preparations were kept at 4°C until observation. For live imaging, neurons were transfected at 7–14 days *in vitro* using the Effecten transfection kit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol.

# Single particle tracking and surface diffusion calculation

Single particle (quantum dot) labelling and microscopy was performed as previously described (Groc *et al.*, 2007b). Briefly, hippocampal primary neurons were incubated for 10 min (37°C) with polyclonal antibodies against GluN2A subunit (Alomone Labs, 1/500), GluN2B subunit (Alomone Labs, 1/500), EPHB2R (R&D systems, 1/500), GFP (Invitrogen, 1/10000); and monoclonal antibodies against  $\alpha 2$  GABA<sub>A</sub>

subunit (gift A. Triller, 1/5000), Kv1.3 (Alomone Labs, 1/2000), haem-agglutinin (HA)-tag (Roche, 1/1000) and patients' IgG. Neurons were then washed and incubated for 10 min (37°C) with quantum dots 655 goat F(ab')<sub>2</sub> anti-rabbit, rabbit F(ab')<sub>2</sub> anti-goat IgG, 655 goat F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse IgG and 655 rabbit F(ab')<sub>2</sub> anti-human IgG (for coupling with patient's IgG) (Invitrogen, 1/1000). Non-specific binding was blocked by the addition of casein (Vector Laboratories) to the quantum dots 15 min before use. For single particle tracking of D1 and GluA1 receptor, hippocampal primary neurons were transfected by either D1-CFP or GluA1-HA and Homer1c-GFP as a synaptic marker. For single particle tracking of GluN2A, GluN2B,  $\alpha 2$  GABAA and EPHB2 receptors, Kv1.3 channel green MitoTracker® (Invitrogen, 1-min incubation, 20 nM) was used as a synaptic marker. Quantum dots were detected by using a mercury lamp and appropriate excitation/emission filters. Images were obtained with an acquisition time of 50 ms with up to 1000 consecutive frames. Signals were detected using an EM-CCD camera (Quantem, Roper Scientific). Quantum dots were followed on randomly selected dendritic regions for up to 20 min. Quantum dot recording sessions were processed with the MetaMorph® software (Universal Imaging Corp.). The instantaneous diffusion coefficient,  $D$ , was calculated for each trajectory, from linear fits of the first four points of the mean-square-displacement versus time function using  $MSD(t) = \langle r^2 \rangle(t) = 4Dt$ . The 2D trajectories of single molecules in the plane of focus were constructed by correlation analysis between consecutive images using a Vogel algorithm.

# Fluorescent recovery after photobleaching

Neurons co-transfected with Homer1c-DsRed and either super-ecliptic pHluorin (SEP) labelled subunits GluN2A-SEP, GluN2B-SEP or GluN1-SEP were placed on the heated stage (37°C) of an inverted confocal spinning-disk microscope (Leica). To test the population of surface GluN subunits-SEP, we used low pH-solution adjusted to pH 5.4 which quenched all the fluorescence indicating that SEP allows the specific visualization of surface receptors (Bard *et al.*, 2010).



Fluorescence was excited using a monochromator controlled by MetaMorph® software (Universal Imaging). To photobleach locally, we used a Sapphire laser 488-20 at 50% power to avoid photo damage. The laser was coupled to the microscope via galvanometric mirrors, which allowed us to photobleach several regions within a short time window. Recovery from photobleach was monitored by two consecutive acquisition periods at 2 and 0.5 Hz acquisition rate, respectively. Recovery curves were corrected for continuous photobleaching and background noise. For the follow-up of cluster fluorescence intensity to assess synaptic receptor content, neurons were co-transfected with Homer1c-DsRed, GluN2A-SEP and GluN2B-SEP. Clusters were imaged over a period of 30 min after a chemically induced potentiation protocol (chemical long-term potentiation), as previously described (Lu *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2004, 2006; Wang *et al.*, 2008), glycine (200 µM) and picrotoxin (5 µM) were applied for 4 min. Bath co-application of glycine and picrotoxin was always applied after the recording of the basal condition in live experiments and the medium was carefully replaced by new equilibrated and heated medium after the protocol application. Fluorescence intensity was measured using MetaMorph® software (Universal imaging) and corrected for photobleaching and background noise.

## In vivo injection and immunohistochemistry

Adult female FVB mice were anaesthetized by isoflurane and stereotaxic surgery was performed. Ejection pipettes were lowered into the dorsal hippocampus at the following coordinates: –2.2 mm from bregma, 1.5 mm from midline, 1.5 mm from brain surface. Purified patient IgG alone (400 nl, 1 mg/ml), purified control IgG alone (400 nl, 1 mg/ml), 200 nl of purified patient IgG (2 mg/ml) mixed with 200 nl ephrin-B2 ligand (50 µg/ml) or 200 nl of purified control IgG (2 mg/ml) mixed with 200 nl ephrin-B2 ligand (50 µg/ml) was injected into the dorsal hippocampus (2 × 200 nl with 200 µm separation distance). For each mouse, two different solutions (purified patient IgGs and ephrin-B2 ligand or purified control IgG and ephrin-B2 ligand) were injected in either the right or left hemisphere. Mice were recovered and perfused 5–7 h after injection with 4% paraformaldehyde (pentobarbital anaesthesia). Brains were removed and bathed in 4% paraformaldehyde (2 h), incubated overnight in 15% sucrose (4°C) and then snap-frozen in isopentane. Coronal sections of the brain (12 µm) were obtained on a microtome (Leica). For immunohistochemistry, after 1 h incubation with 2% normal goat serum in phosphate-buffered saline at room temperature, coronal sections of the brain were incubated with polyclonal antibodies against GluN2A subunit (Alomone Labs, 1/100) or monoclonal antibodies against GluN1 subunit (Millipore, 1/500) overnight at room temperature. Fluorescent revelation was carried out with fluorophore-labelled secondary antibodies anti-mouse Alexa568 (Invitrogen, 1/400) or anti-rabbit Alexa488 (Invitrogen, 1/400) for 2 h at room temperature. Images were obtained using a confocal microscope (SP2, Leica) and processed for analysis. Using MetaMorph software (Universal imaging), a threshold was applied on each image in order to extract cluster staining and the cluster fluorescence was measured.

## Calcium imaging

Hippocampal neurons (14–18 days *in vitro*) were incubated with a fluorescent calcium indicator Fluo-4, AM FluoroPure™ grade (Invitrogen, 2 µM, 10 min, 37°C) in artificial CSF (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.6 mM, HEPES 10 mM, D-glucose

24 mM, Sigma Aldrich). Neurons were then washed and placed on the heated stage (37°C) of an inverted confocal spinning-disk microscope (Leica) and imaged over a period of 30 min (acquisition rate 0.02 Hz) after glutamate (30 µM, Sigma Aldrich) stimulation in the presence of an AMPAR antagonist [2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulphamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione (NBQX), 20 µM, Tocris], Na-channel blocker [tetrodotoxin (TTX), 1 µM, Tocris] and L-type calcium channel blocker (nifedipine, 5 µM, Tocris). Glutamate stimulation was always applied after the recording of the basal condition. In control conditions, a transient calcium increase was blocked by the NMDA receptor antagonist [2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP-5), 10 µM, Tocris]. Fluorescence intensity was measured using MetaMorph software (Universal imaging) and corrected for photobleaching and background noise.

## Antibody feeding assay

Primary hippocampal neuron cultures were prepared from embryonic C57Bl6 mouse brains (embryonic Day 17) as previously described (Goslin and Banker, 1991). Live hippocampal neurons (14–17 days *in vitro*) were incubated for 20 min at 37°C with an antibody directed against the extracellular region of the NMDA receptor subunit GluN1 (R1JHL, Calbiochem). After washing in phosphate-buffered saline, neurons were treated in neurobasal medium with patient or control IgG with or without clustered ephrin-B2-Fc for 20 h at 37°C. Then, neurons were fixed for 4 min at room temperature in 4% paraformaldehyde/4% sucrose. Pre-labelled surface receptors were stained, without permeabilization, using a saturating amount of Alexa 488-conjugated secondary antibody (Invitrogen) overnight at 4°C. Neurons were subsequently permeabilized at room temperature for 30 min with a phosphate-buffered saline/bovine serum albumin/0.3% Triton X-100 solution, and pre-labelled internalized receptors were stained with a biotinylated-conjugated secondary antibody followed by streptavidin-Alexa 647 (Invitrogen) treatment. Then, neurons were incubated with an antibody directed against microtubule-associated protein 2 (MAP2, Millipore), followed by an Alexa 555-conjugated secondary antibody (Invitrogen). Finally neurons were counterstained with DAPI. Fluorescence images were acquired with a Zeiss microscope equipped with epifluorescent illumination and apotome technology. Stained neurons were then blindly analysed using ImageJ software (NIH). Images were first thresholded to assess apical dendrite area. The number of GluN1 subunit clusters was assessed in each region of interest and divided by the region of interest area. Receptor clusters were ~0.2–0.6 µm in length. To calculate the proportion of surface NMDA receptors that were maintained at the cell surface, the density of surface GluN1 subunit clusters was divided by the total (surface + intracellular) density of GluN1 subunit. All values were normalized to those of neurons treated with control IgG. Each condition was performed on six coverslips and was expressed as mean ± SEM.

## Co-immunoprecipitation and western blot

Cultured hippocampal neurons (15 days *in vitro*) were incubated with IgGs from Patient 09-343 (25 µg/ml) and Control SNP793 (25 µg/ml) for 5 h at 37°C. Cells were then lysed with PathScan® sandwich ELISA lysis buffer (Cell Signalling Technology, Inc), for 5 min on ice. Lysates were sonicated and spun at 8000 g for 15 min at 4°C. Supernatants were quantified, aliquoted and stored at –80°C. EPHB2R (goat polyclonal antibody, 12 g, R&D systems) antibody was incubated under

constant agitation at 37°C overnight with 20 µl of tosyl-activated-magnetic beads (Dynabeads M-280 tosylactivated, Invitrogen), which were washed twice with coupling buffer A (0.1 M borate buffer pH 9.5) and supplemented with coupling buffer C (3 M ammonium sulphate in buffer A) beforehand. The antibody-bead mixtures were washed with blocking buffer (phosphate-buffered saline pH 7.4/0.5% bovine serum albumin), 1 h at 37°C under constant agitation and with washing buffer (phosphate-buffered saline pH 7.4/0.1% bovine serum albumin). Cell lysates treated with patient and control IgG were added to antibody-bead mixtures and incubated under constant agitation for 4 h at 24°C. Beads were then thoroughly washed four times with PathScan® sandwich ELISA lysis buffer. The beads were resuspended into 40 µl of 2× sample buffer. Before loading on a gel, the samples were boiled at 100°C for 5 min. Sample supernatants (10 µl, without beads) were separated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (Mini-Protein TGX precast gels 4–20%, Bio-Rad) for 40 min at 200 V and transferred onto nitrocellulose membrane for 1 h at 100 V. After blocking for 1 h in 5% milk in Tris-saline-0.05% Tween-20 (TBST), the membranes were incubated for 1 h at room temperature with a monoclonal antibody against GluN1 subunit (clone 54.1, BD Pharmingen) or a monoclonal antibody against tubulin (clone TUB 2.1, Sigma), diluted at 1 and 0.2 g/ml, respectively, in TBST 0.5% milk. Secondary antibodies coupled with horseradish peroxidase were used at 1:10 000 in TBST 0.5% milk. Detection was performed using the SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate detection System (Pierce) revealed with a ChemiGenius system (Syngene). Quantification of band intensity was performed using Genetools software (Syngene).

## Data and statistical analysis

The instantaneous diffusion coefficient is reported as the median ± 25–75% (interquartile range, IQR). All of the other group values are expressed as mean ± SEM. Each data series was obtained from 2 to 5 independent experiments (e.g. for each *in vitro* data set: 3–5 independent cell cultures, 6–10 different cover-slips per cell culture). Comparisons between groups were either performed with parametric statistical tests (surface immunostaining) or with non-parametric Mann–Whitney test (single quantum dots). Significance levels were defined as \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001.

## Results

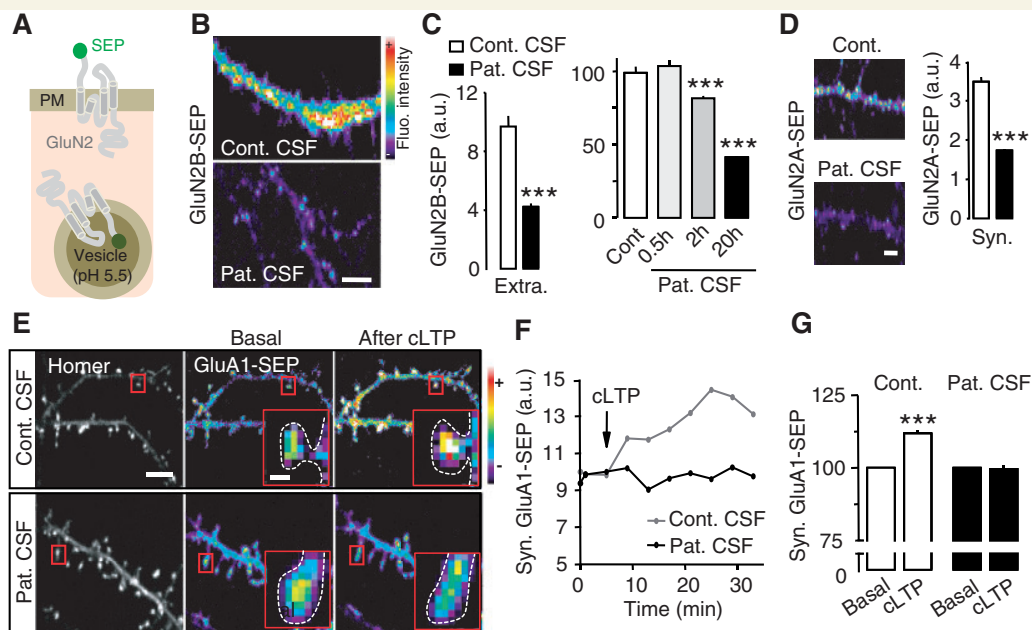
### Patient cerebrospinal fluid rapidly alters the surface trafficking of GluN2-NMDA receptor and prevents glutamate synapse long-term potentiation

In anti-NMDA receptor encephalitis, the epitopes of the autoimmune antibodies are located in the extracellular region of GluN1 subunit (Dalmau *et al.*, 2008). Furthermore, incubation of hippocampal neurons, for several consecutive days, with patient IgGs potently decreases the surface content of NMDA receptors (Hughes *et al.*, 2010). To better explore the kinetics and the molecular cascade involved in this process, we first investigated, on the short-term range, the impact of anti-NMDA receptor antibodies from patient CSF or purified IgGs (Table 1) on the surface content of the two main hippocampal NMDA receptor subtypes,

i.e. the GluN2A- and GluN2B-NMDA receptors (Wenthold *et al.*, 2003). In cultured hippocampal neurons, these NMDA receptor subunits are exclusively located in the postsynaptic membrane compartment (Bard *et al.*, 2010). Hippocampal neurons were transfected with either the GluN2A or GluN2B subunit tagged with SEP at their extracellular N-termini. SEP is a pH-sensitive variant of enhanced GFP that exhibits bright fluorescence when exposed to the exterior of the cell, but has relatively little fluorescence while in internal acidified trafficking organelles (Ashby *et al.*, 2004) (Fig. 1A). This allows us to track over time the surface content of NMDA receptors in live hippocampal neurons. Under basal conditions, both GluN2A- and GluN2B-NMDA receptors were detected at the neuronal surface with a clear enrichment of GluN2A-NMDA receptors in postsynaptic density of glutamatergic synapses (detected by the presence of the postsynaptic protein Homer 1c-DsRed) (Supplementary Fig. 1) when compared with GluN2B-NMDA receptors, which are mostly extrasynaptic (Tovar and Westbrook, 1999; Groc *et al.*, 2006) (Fig. 1B). Patient CSF incubation (20 h, dilution 1/300) significantly decreased the surface content of GluN2A- and GluN2B-NMDA receptors (Fig. 1B–D), consistent with the already described GluN1-NMDA receptor content decrease after 1–7 days incubation with patient CSF (Dalmau *et al.*, 2008; Hughes *et al.*, 2010). Interestingly, this effect was time-dependent since after 2 h of incubation the surface content of GluN2B-NMDA receptors was already significantly reduced by 19% (Fig. 1C). Importantly, these major changes in NMDA receptor content were not due to massive loss in synaptic contacts since the overall number of glutamatergic synapses, i.e. the number of Homer clusters, remained unaffected by patient CSF incubation (up to 24 h) (Supplementary Fig. 2).

Since synaptic NMDA receptors play a key role in synaptic plasticity processes (Yashiro and Philpot, 2008) that serve as cellular substrates for learning and memory (Morris, 2006), we explored the functional impact of patient CSF on synaptic long-term potentiation (chemical long-term potentiation; Lu *et al.*, 2001, 2007; Wang *et al.*, 2008). Based on the massive reduction of surface and synaptic NMDA receptors one would predict that the induction of synaptic long-term potentiation is altered in neurons exposed to patient CSF. To test this, the synaptic content of the glutamatergic AMPAR containing the GluA1 subunits was measured using GluA1-SEP expression in hippocampal neurons (Fig. 1E). In neurons incubated with the control CSF (20 h, dilution 1/300), the synaptic content of GluA1-AMPA was significantly increased following the induction of chemical long-term potentiation (Fig. 1E–G). However, in neurons exposed to patient CSF (20 h, dilution 1/300) the long-term potentiation protocol failed to increase the synaptic content of surface AMPAR from the basal level (Fig. 1E–G), indicating that patient CSF drastically reduces the plastic range of glutamate synapses. It should be noted that a shorter incubation (tens of minutes range) of hippocampal neurons with patients' autoantibodies already reduces the extent of long-term potentiation of excitatory currents in the CA1 area (Zhang *et al.*, 2012). Together, these data reveal that patient CSF, containing the anti-NMDA receptor antibodies, rapidly reduced GluN2A- (synaptic) and GluN2B- (extrasynaptic) NMDA receptor surface content and reduced potentiation of





**Figure 1** Patient CSF decreases the surface content of both GluN2A- and GluN2B-NMDA receptor in a time-dependent manner and prevents long-term potentiation (LTP) of glutamate synapses. (A) Schematic representation of GluN subunit tagged with SEP protein at its N-terminus (extracellular). SEP is quenched at acidic pH (e.g. cycling vesicles) and only emits fluorescence in dendrites when inserted at the plasma membrane. (B) GluN2B-SEP dendritic fragments from neurons incubated 20 h either with control (Control SNP 793 CSF; dilution 1/300) or patient CSF (Patient 09-049 CSF; dilution 1/300). Scale bar = 5  $\mu$ m. (C) Fluorescence intensity of GluN2B-SEP was significantly decreased by patient CSF in the extrasynaptic compartments (left) (control CSF:  $n = 100$  clusters; patient CSF:  $n = 60$ , 20-h incubation). Moreover, patient CSF decreased, in a time dependent manner (0.5, 2 or 20 h), the global fluorescence intensity of GluN2B-SEP with a significant decrease already observed at 2 h (right). Data from each time point was compared to its own control value (control  $n = 278$  clusters; patient CSF 0.5 h:  $n = 40$ ; patient CSF 2 h:  $n = 50$ , patient CSF 20 h:  $n = 217$ ). (D) GluN2A-SEP dendritic fragments from neurons incubated for 20 h either with control (Control SNP 793 CSF; dilution 1/300) or patient CSF (Patient 09-049 CSF; dilution 1/300). Scale bar = 5  $\mu$ m. The fluorescence intensity of GluN2A-SEP was significantly decreased by patient CSF in the synaptic compartment (control CSF:  $n = 115$  clusters; patient CSF:  $n = 104$ ). (E) Representative dendritic fragments of hippocampal neurons expressing Homer 1c-DsRed and AMPAR (GluA1-SEP) before (basal) and after chemical long-term potentiation (cLTP) protocol. The pseudocolour GluA1-SEP subunit representation shows the different intensity levels of the GluA1-SEP staining. Note that after chemical long-term potentiation the GluA1-SEP fluorescence (colour-coded) increased in postsynaptic areas. In neurons incubated with control CSF (Control SNP 793 CSF) the relative GluA1-SEP fluorescence increased after chemical long-term potentiation whereas in the presence of Patient 09-030 CSF (20 h; 1/300) the relative GluA1-SEP fluorescence remains stable before and after chemical long-term potentiation (lower panels). Scale bars: main panels = 6  $\mu$ m; insets = 300 nm. (F) Representative quantification of GluA1-SEP synaptic clusters (at least 30 min) in the presence of control (grey line) or patient (black line) CSF. The induction of chemical long-term potentiation after a 5-min baseline period increased GluA1-SEP synaptic fluorescence (arbitrary unit, a.u.) in control but not in patient CSF. (G) Relative synaptic GluA1-SEP intensity before and after chemical long-term potentiation in control ( $n = 211$  synapses) and patient CSF conditions ( $n = 315$  synapses). Note the significant increase to 112% of basal condition in control CSF after chemical long-term potentiation. \*\*\* $P < 0.001$ .

glutamatergic synapses, further suggesting that patient anti-NMDA receptor antibodies affect the trafficking of surface NMDA receptor.

## Patient immunoglobulin Gs differentially affect synaptic (GluN2A) and extrasynaptic (GluN2B) NMDA receptor surface diffusion

Over the last decade it has emerged that the surface distribution of NMDA receptors highly depends on their diffusion in the plasma membrane (Bard and Groc, 2011). To identify the cellular pathway(s) by which patient anti-NMDA receptor antibodies

control the surface content of GluN2-NMDA receptor, we explored the possibility that patient CSF primarily affects the surface dynamics of NMDA receptors. For this, we used two complementary approaches. First, we expressed GluN2A-SEP and GluN2B-SEP in hippocampal neurons and investigated the impact of patient CSF on the surface diffusion using the fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) approach (Lippincott-Schwartz and Patterson, 2003) (Fig. 2A). Strikingly, the fraction of mobile surface GluN2A- and GluN2B-NMDA receptor, measured by the amount of fluorescence recovery (Fig. 2B, C), was differentially affected by patient CSF (20 h, dilution of 1/300). Indeed, patient CSF significantly increased the mobile fraction of GluN2A-NMDA receptor and significantly decreased the mobile fraction of GluN2B-NMDA receptor (Fig. 1C), suggesting that

synaptic GluN2A-NMDA receptor was mostly removed from synapses whereas extrasynaptic GluN2B-NMDA receptors were mostly cross-linked.

To directly investigate the impact of patient anti-NMDA receptor antibodies at the single receptor level, we used the single nanoparticle (quantum dot) approach that isolates single particle-receptor complexes with a sub-wavelength precision (Groc *et al.*, 2007b; Triller and Choquet, 2008) (Fig. 2D). First, purified IgGs containing anti-NMDA receptor antibodies were isolated from patients and used to further identify the nature of their membrane target. Consistent with previous observations (Dalmau *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 2010), the surface labelling of the patient IgGs was similar to the one against the surface GluN1 subunit, which was concentrated in synaptic areas (Supplementary Fig. 3). Then, to measure in live neurons the membrane dynamics of the IgGs' target and investigate the possible acute (minute range) effect of the IgGs, we coupled patient IgG to single quantum dots, incubated neurons for ~10 min and tracked the complexes over time (Supplementary Fig. 4A). Globally, two main surface behaviours were observed, i.e. a high diffusion pattern that explored a large dendritic area and a low diffusion pattern that was highly confined (Supplementary Fig. 4A). When the diffusive trajectories crossed glutamatergic synapses they were only transiently retained (Supplementary Fig. 4B), whereas the slowly diffusing trajectories were highly retained in such synapses. When we compared, in the same neuronal preparation, the diffusion characteristics (per cent of immobile receptors that are defined as: diffusion coefficient  $< 0.005 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) of surface GluN2A- and GluN2B-NMDA receptor, GluA2-AMPA,  $\alpha 2$ -GABA<sub>A</sub>R and EPHB2R, it clearly emerged that patient IgGs quantum dot trajectories displayed a comparable immobile receptor fraction with GluN2A- and GluN2B-NMDA receptors (Supplementary Fig. 4C). This result suggests that patient anti-NMDA receptor IgGs initially target surface NMDA receptors without inducing, at least in the tens of minute time range used in this experiment, a major effect on their surface diffusion.

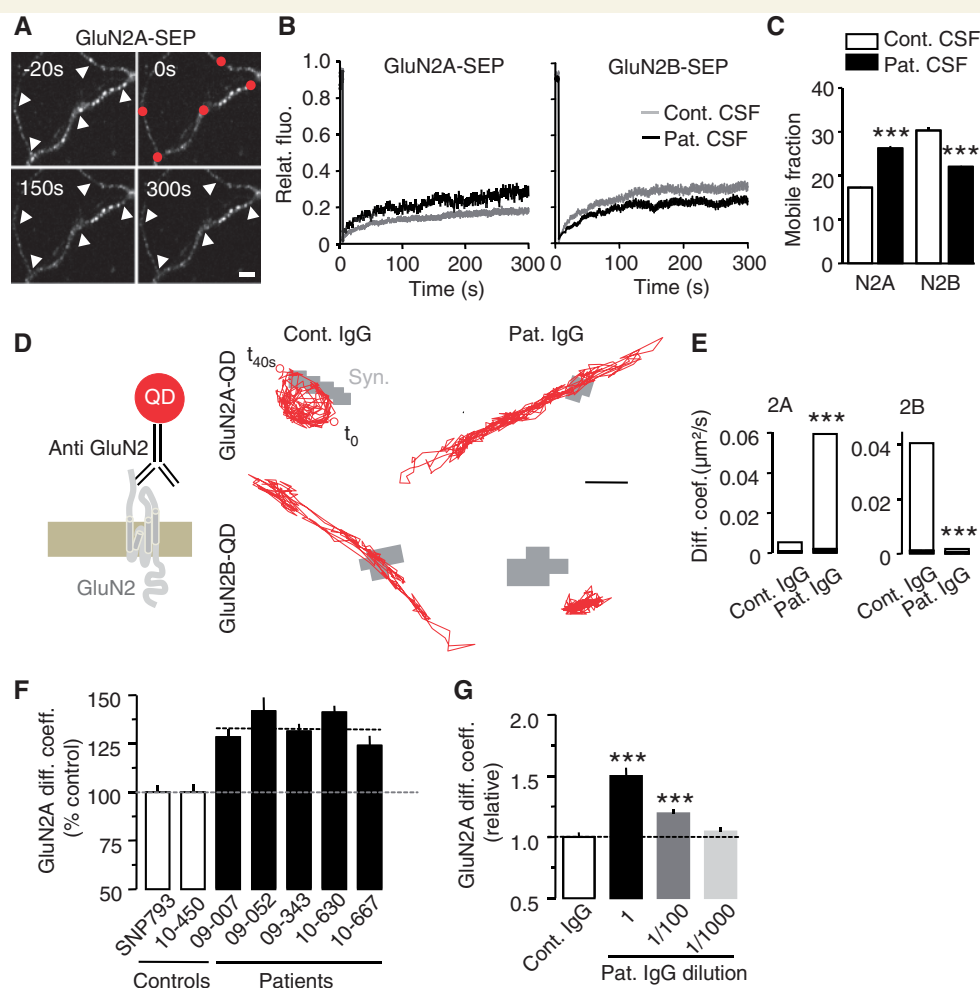
We then measured the effects of IgGs on hippocampal neurons incubated for at least 2 h with purified IgGs from anti-NMDA receptor patients (Patient IgG: 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or control patients (Control IgG: 2 h, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). After incubation, single GluN2A- or GluN2B-NMDA receptor quantum dot complexes were tracked at the surface of neurons. The imaging sessions were done blindly, not knowing control versus patient conditions. Surface GluN2A-NMDA receptor that are confined and anchored in synapses under the control IgG condition became highly diffusive and accumulated in the extrasynaptic compartment under the patient IgG condition (Fig. 2D and E). In contrast, surface GluN2B-NMDA receptors that are rather diffusive under the control IgG condition became highly confined under the patient IgG condition (Fig. 2D and E). Thus, consistent with the fluorescence recovery after photobleaching data, the surface confinement of GluN2B-NMDA receptor likely results from an IgG-induced cross-linking of the surface receptors (Groc *et al.*, 2008; Heine *et al.*, 2008; Hughes *et al.*, 2010) whereas the lateral escape of GluN2A-NMDA receptors outside the synapse revealed the presence of a critical retention mechanism that is prevented by the binding of patient IgGs on extracellular domain(s) of NMDA receptors

(Dalmau *et al.*, 2008). In order to compare the cellular effect of IgGs from different patients and controls, we blindly measured the impact of IgGs from five different patients with anti-NMDA receptor antibodies and two different control patients (Table 1) on the surface diffusion of the synaptic GluN2A-NMDA receptors, since these receptors were rapidly displaced from synapses by the presence of the patient IgGs. As shown in Fig. 2F, IgGs from each patient similarly displaced GluN2A-NMDA receptors out of synapses within a 2-h incubation period whereas the two control IgGs had no effect (Fig. 2F), indicative of an all-or-none effect. In addition, this effect was dose-dependent since high dilutions of patient IgGs (Patient 09-030, Table 1) reduced the effect (Fig. 2G). Finally, it should be noted that we previously demonstrated that the presence of 'control' IgG (e.g. anti-rabbit IgG) does not affect the surface diffusion of glutamate receptors, measured by single nanoparticle/molecule tracking and fluorescence recovery after photobleaching approaches (Groc *et al.*, 2007b, 2008; Heine *et al.*, 2008). Together, these data demonstrate that IgGs from different patients with anti-NMDA receptor antibodies interfere with the same potency and in a dose-dependent manner with the synaptic retention of GluN2A-NMDA receptors, suggesting that IgGs of patients with NMDA receptor encephalitis prevent a molecular interaction and/or cellular pathway that anchors GluN2A-NMDA receptor in the postsynaptic area.

## The interaction between surface GluN2A-NMDA receptors and EPHB2R is disrupted by patient immunoglobulin Gs

To uncover this molecular pathway we first investigated the impact of patient IgGs on the trafficking of other surface neurotransmitter receptors and ion channels that are present in the same neurons and surface compartments. In presence of patient IgGs (2–3 h), we measured the lateral diffusion of the surface GluA1-AMPA, the metabotropic dopamine D1 receptor, the  $\alpha 2$ -GABA<sub>A</sub>R and potassium ion channel Kv1.3 D1 receptor surface diffusion was not affected by patient IgGs (Fig. 3A and B). The GluA1-AMPA diffusion was slightly increased although to a much lower extent than for GluN2-NMDA receptor (Fig. 3A and B). The diffusion of the  $\alpha 2$ -GABA<sub>A</sub>R, which laterally explores both inhibitory and excitatory synapses (Bannai *et al.*, 2009), was not affected by patient IgGs. Finally, the surface diffusion of the potassium channel Kv1.3, which is present all over the dendritic tree and binds to the same PDZ domain-containing scaffold proteins as the NMDA receptors (Lim *et al.*, 2002), was unaffected by patient IgGs (Fig. 3A and B). Taken together, these data indicate that patient IgGs do not have major influence on the surface dynamics of other receptors and ion channels, suggesting a rather specific action on GluN2-NMDA receptor trafficking.

The intracellular domain of the GluN subunits of NMDA receptors interact with numerous partners (Wenthold *et al.*, 2003). However, only few direct partners of the extracellular domain of GluN subunits have been identified. Among these, the EPHB2R (Dalva *et al.*, 2000) binds ephrin-B2 ligand in the synapses and



**Figure 2** Patient IgG differentially affects the surface diffusion of GluN2A- and GluN2B-NMDA receptors. (A) Representative acquisition of fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) of GluN2A-SEP in control CSF. Some GluN2A-SEP clusters were photobleached (red circles) and the fluorescence recovery was followed over time (up to 300 s). Scale bar = 5  $\mu\text{m}$ . (B) Expression of GluN2A- (left) and GluN2B- (right) SEP fluorescence recovery versus time after control (grey line; Control SNP 793 CSF; 20 h, 1/300) or patient (Patient 09-030 CSF; black line; 20 h, 1/300) CSF incubation. (C) The mobile fraction was significantly increased for GluN2A-SEP (control  $n = 68$  photobleached clusters,  $n \geq 4$  neurons; patient  $n = 24$ ,  $n \geq 4$  neurons; \*\*\* $P < 0.001$ ) and decreased for GluN2B-SEP (control  $n = 55$ ,  $n \geq 4$  neurons; patient  $n = 73$ ,  $n \geq 4$  neurons;  $P < 0.001$ ). (D) Schematic representation of the surface labelling of a GluN2 subunit using a single anti-GluN2 antibody quantum dot (QD) complex (left). Representative trajectories of surface GluN2A quantum dots and GluN2B quantum dots (right, red lines, 1000 frames, 50 ms acquisition) in neurons incubated with either control or patient IgG (2 h, 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Glutamate synapses correspond to grey areas. Scale bar = 500 nm. (E) The instantaneous diffusion coefficient distributions (median  $\pm$  25–75% IQR) of GluN2A and GluN2B subunits in control or patient IgGs (control IgG ‘SNP 793’ 2A: median =  $9 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ , 25–75% =  $3 \times 10^{-4}$ – $5 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $n = 2085$  trajectories; patient IgG ‘09-052’ 2A: median =  $2 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ , 25–75% =  $6 \times 10^{-4}$ – $5 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $n = 1172$ ; control IgGs ‘SNP 793’ 2B: median =  $1 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ , 25–75% =  $3 \times 10^{-4}$ – $4 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $n = 1920$ ; patient IgG ‘09-052’ 2B: median =  $6 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ , 25–75% =  $3 \times 10^{-4}$ – $2 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $n = 1209$ ). Note the significant and opposite effect of patient IgG on the GluN2 subunit surface diffusion ( $P < 0.001$ ). (F) Membrane instantaneous diffusion coefficient of GluN2A subunit was significantly increased in the presence of five different patient IgGs (Patient 09-007:  $n = 1284$  trajectories,  $P < 0.001$ ; Patient 09-052:  $n = 1937$  trajectories,  $P < 0.001$ ; Patient 09-343:  $n = 1266$  trajectories,  $P < 0.001$ ; Patient 10-630:  $n = 1824$  trajectories,  $P < 0.001$ ; Patient 10-667:  $n = 735$  trajectories,  $P < 0.001$ ) when compared to two control IgG (Control SNP793:  $n = 1478$  trajectories; Control 10-450:  $n = 1329$  trajectories). Note that the increase of GluN2A diffusion coefficient was similar between the different patient IgGs. All these experiments were performed blindly. (G) Membrane instantaneous diffusion coefficient of GluN2A subunit after 2-h incubation with different dilutions of patient IgG [control IgGs SNP793: 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $n = 1290$  trajectories and patient IgGs, Patient 09-052 at three different concentrations: 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $n = 571$  trajectories (dilution 1), 50 ng/ml,  $n = 1501$  trajectories (dilution 1/100), 5 ng/ml,  $n = 1753$  trajectories (dilution 1/1000)].

efficiently clusters NMDA receptors when activated (Dalva *et al.*, 2000, 2007). Thus, the possibility emerges that the binding of patient IgGs on extracellular domains of NMDA receptors reduces the association with EPHB2R. In order to test this hypothesis, we first tracked surface EPHB2R using the single quantum dots approach under different IgG conditions. Under the control IgG condition, EPHB2R were highly diffusive and explored a large area of the neuronal surface (Fig. 3C). Interestingly, in the synapse, EPHB2R quantum dot diffusion was significantly increased by patient IgGs (Fig. 3C and D), consistent with a disruption of the interaction between EPHB2R and a membrane interactor. To investigate whether patient IgGs prevent the direct interaction between EPHB2R and NMDA receptors, we co-immunoprecipitated EPHB2R with the obligatory GluN1 subunit of the NMDA receptor in the presence of control or patient IgGs (5 h, 255 µg/ml). Strikingly, patient IgGs reduced the amount of the EPHB2R–NMDA receptor complex when compared with co-immunoprecipitation in the presence of control IgGs (Fig. 3E), indicating that the interaction between EPHB2R and NMDA receptors is indeed disrupted by patient IgGs. In addition, this disruption reduced the size of the membrane EPHB2R clusters, which are mostly synaptic (~70%) (Fig. 3F and G). Together, these data indicate that patient IgGs prevent the surface interaction between EPHB2R and NMDA receptors, leading to a lateral dispersal of synaptic EPHB2R and NMDA receptors.

## Activation of EPHB2R prevents the majority of patient immunoglobulin G-induced NMDA receptor surface trafficking changes

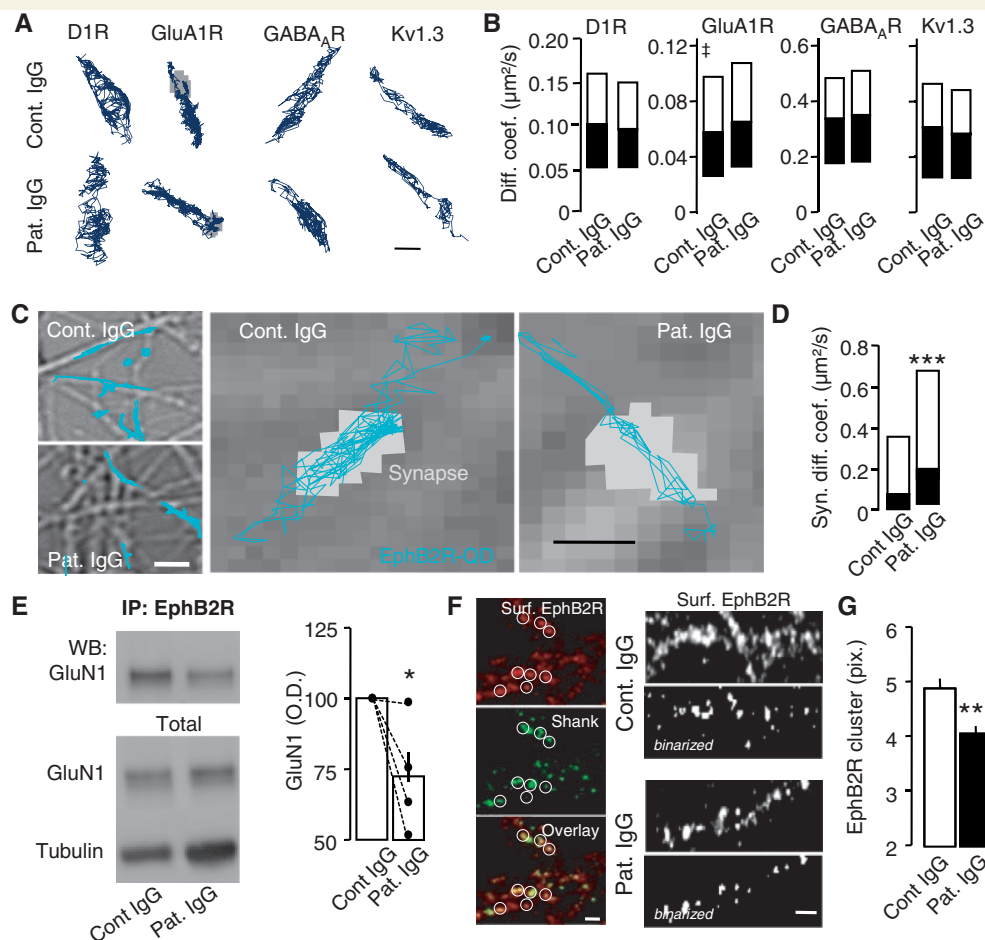
In an attempt to prevent the cellular effects of patient IgGs and favour the retention of NMDA receptors in the plasma membrane and in synapses, we took advantage of the fact that the activation of EPHB2R by its ligand, ephrin-B2, increases the clustering of synaptic NMDA receptors (Dalva *et al.*, 2000, 2007). To investigate the impact of EPHB2R activation on surface distribution of NMDA receptors, i.e. testing whether the activation of EPHB2R can counteract the patient IgG-induced NMDA receptor surface dispersal, we first incubated neurons with ephrin-B2 (1255 ng/ml for 25 h) and control IgGs. We reported no significant change in GluN2A–NMDA receptor diffusion (Fig. 4A and B). However, in the presence of patient IgGs (2 h), ephrin-B2 prevented the increased surface diffusion and lateral escape of synaptic GluN2A–NMDA receptors (Fig. 4A and B). This effect was specific since the activation of the N-cadherin receptor, which is present in these synapses and acts indirectly on the NMDA receptor signalling (Tai *et al.*, 2008), did not affect patient IgG-induced lateral redistribution of synaptic GluN2A–NMDA receptors (Fig. 4A and B). To further test the role of this interaction on the surface receptor dynamics, neurons were incubated with antibodies directed against an extracellular epitope of EPHB2R and surface GluN2A–NMDA receptors were tracked at the neuronal surface. Remarkably, GluN2A–NMDA receptor surface diffusion was greatly increased (Fig. 4A and B) in presence of anti-EPHB2R antibodies, confirming that in live neurons the synaptic retention of

GluN2A–NMDA receptors highly relies on an extracellular interaction between EPHB2R and NMDA receptors. Altogether, these data demonstrate that the ephrin-B2-induced activation of EPHB2R rescues the synaptic retention of GluN2A–NMDA receptors in the presence of NMDA receptor autoantibodies, most likely through the maintenance of the extracellular association between EPHB2 and NMDA receptors.

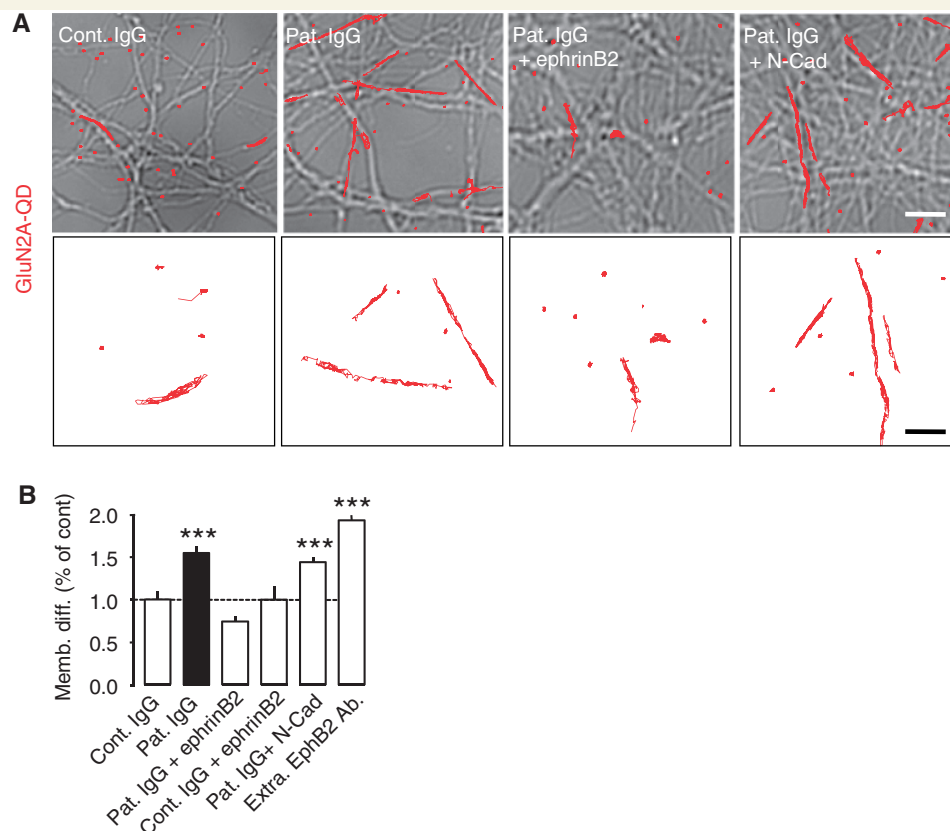
Based on these results, one might predict that the activation of EPHB2R signalling also affects, in conjunction with the surface dynamics, the membrane content of functional NMDA receptors. To test this, we used calcium imaging to estimate the surface content of functional NMDA receptors in hippocampal neurons exposed to control or patient IgGs (2–45 h). Glutamate (305 µM) was applied onto hippocampal neurons, loaded with a calcium indicator (Fluo-4), in the presence of an AMPAR antagonist (NBQX, 20 µM), sodium channel blocker (TTX, 1 µM) and L-type calcium channel blocker (nifedipine, 5 µM). In control conditions, glutamate produced a transient calcium rise that was blocked by the bath application of the NMDA receptor antagonist AP-5 (10 µM) (Fig. 5A and B). The presence of patient IgGs (2 h) significantly decreases the glutamate-induced calcium rise. It should be noted that this decrease of functional endogenous NMDA receptors is consistent with the surface content decrease of over-expressed GluN2A/B–NMDA receptors (Fig. 1). Remarkably, incubation of neurons with patient IgGs and ephrin-B2 ligands (500 ng/ml for 45 min) produced a large calcium influx upon glutamate stimulation that was significantly higher than the patient IgGs alone condition (Fig. 5C). It could be noted that in the control condition ephrin-B2 ligand only tends to increase the glutamate-induced calcium rise (Fig. 5C). Collectively, these data show that the activation of EPHB2R by its ligand prevents the decrease in functional NMDA receptor and favours their surface retention in presence of patient IgGs.

To further determine how EPHB2R activation impacts on the membrane content of NMDA receptors in the presence of patient IgG, we used an assay that allows the staining of both internalized and remaining surface NMDA receptors in hippocampal neurons. We monitored NMDA receptor internalization by immunostaining the obligatory GluN1 subunit in live neurons because it associates with EPHB2R at the cell surface upon ephrin-B2 stimulation (Dalva *et al.*, 2000). In control conditions, a significant internalization of NMDA receptors was observed after 20 h of treatment (Control SNP793 IgG) (Fig. 5D). Stimulation with ephrin-B2 ligand Fc, which allows a significant activation of EPHB2Rs, did not change the surface and total GluN1 subunit cluster density when combined with control IgG (Fig. 5E and F). In contrast, treatment with Patient 10-630 IgG significantly decreased the surface GluN1 subunit cluster density compared with control IgG (Fig. 5E), as previously reported (Hughes *et al.*, 2010). Noticeably, this internalization process was not reflected by a parallel increase in the internalized GluN1 subunit cluster density (Fig. 5E). Thus, we reported a decrease in the total GluN1 subunit cluster density (Fig. 5F), suggesting that patient IgG depleted cell surface NMDA receptors by enhancing both their internalization and subsequent degradation. Remarkably, activation of EPHB2R in the presence of patient IgG prevented both the decrease in surface and total GluN1 cluster densities when compared with patient





**Figure 3** Patient IgG alters the EPHB2R surface diffusion and clustering by disturbing the interaction between surface GluN2A-NMDA receptor and EPHB2R. (A) Representative trajectories of surface dopamine D1 receptor, GluA1-AMPA,  $\alpha 2$ -GABA<sub>A</sub>R and potassium channel Kv1.3 (1000 frames, 50 ms acquisition) in neurons incubated with either control or patient IgG during 2 h. Glutamate synapses correspond to grey areas. Scale bar = 500 nm. (B) The instantaneous diffusion coefficient distributions (median  $\pm$  25–75% IQR) of dopamine D1 receptor, GluA1-AMPA,  $\alpha 2$ -GABA<sub>A</sub>R and potassium channel Kv1.3 in Control SNP793 or Patient 09-052 IgGs (control D1 receptor: median =  $9 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ , 25–75% =  $5 \times 10^{-2}$ – $1 \times 10^{-1} \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $n = 1639$  trajectories; patient D1 receptor: median =  $1 \times 10^{-1} \mu\text{m}^2/\text{s}$ , 25–75% =  $5 \times 10^{-2}$ – $1.5 \times 10^{-1} \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $n = 1295$ ,  $P > 0.05$ ; control GluA1: median =  $5 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ , 25–75% =  $3 \times 10^{-2}$ – $9 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $n = 2679$ ; patient GluA1: median =  $6 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ , 25–75% =  $3 \times 10^{-2}$ – $1.2 \times 10^{-1} \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $n = 2780$ ;  $\ddagger P < 0.001$ ; control  $\alpha 2$ -GABA<sub>A</sub>R: median =  $0.36 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , 25–75% =  $0.19$ – $0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $n = 1639$  trajectories; patient  $\alpha 2$ -GABA<sub>A</sub>R: median =  $0.34 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , 25–75% =  $0.19$ – $0.48 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $n = 1639$  trajectories,  $P > 0.05$ ; control Kv1.3: median =  $0.31 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , 25–75% =  $0.18$ – $0.43 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $n = 1047$  trajectories; patient Kv1.3: median =  $0.32 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , 25–75% =  $0.18$ – $0.45 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $n = 734$  trajectories,  $P > 0.05$ ). (C) Representative trajectories of surface EPHB2R (blue lines, 1000 frames, 50 ms acquisition, scale bar = 5  $\mu\text{m}$ ) and enlarged trajectories (right panels) of surface EPHB2R within or outside synapses (grey areas) in neurons incubated with either Control SNP793 or Patient 09-052 IgGs during 2 h. Scale bar = 400 nm. (D) Synaptic surface diffusion of EPHB2 receptor significantly increased in the presence of patient IgG ( $n = 290$ ) when compared with control IgG ( $n = 240$ ) ( $P < 0.001$ ). (E) Representative immunoblots showing the immunoprecipitation (IP) of EPHB2R with the GluN1 subunit in hippocampal cultures treated with either Control SNP793 or Patient 09-343 IgGs (left panel). The ‘total’ panel represents the total content of GluN1 and tubulin (input material) in control and patient conditions. Right panel: Patient IgGs reduced the optical density (O.D.) of GluN1 detection after EPHB2R immunoprecipitation when compared with control IgG conditions ( $n = 4$  independent experiments). The immunoprecipitation amount signal was normalized to tubulin. (F) Left: Dendritic fragments from neurons incubated for 3 h either with Control SNP793, (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or Patient 09-343, (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) IgGs and immunostained with surface EPHB2 receptors and postsynaptic density protein Shank. Overlay image shows high synaptic localization of surface EPHB2R. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ . Right panels: Enlarged dendritic fragments of the raw surface EPHB2R detection (top) and binarized images (bottom), which highlight the EPHB2R surface clusters. Scale bar = 5  $\mu\text{m}$ . (G) The size of the surface EPHB2R clusters was significantly reduced in a presence of patient IgG ( $n = 616$  clusters) when compared with control IgG ( $n = 783$  clusters). \*\*\* $P < 0.001$ .



**Figure 4** Patient IgG impact on GluN2A-NMDA receptor surface diffusion by disrupting NMDA receptor-EPHB2R interaction.

(A) Representative trajectories of surface GluN2A-NMDA receptors (red lines, 1000 frames, 50 ms acquisition) in neurons incubated with either Control SNP793 IgG (5 µg/ml, 2 h), Patient 09-052 IgG (5 µg/ml, 2 h), patient IgG and ephrin-B2 ligand (Patient 09-052 IgG + ephrin-B2, 5 µg/ml, 2 h, ephrin-B2 ligand: 125 ng/ml), patient IgG and N-cadherin (Patient 09-052 IgG + N-cadherin, 5 µg/ml, 2 h; N-cadherin: 125 ng/ml). Scale bar = 10 µm. (B) Membrane instantaneous diffusion coefficient was significantly increased in the presence of patient IgG ( $n = 743$  trajectories,  $P < 0.001$ ), patient IgG with N-cadherin ( $n = 2024$ ,  $P < 0.001$ ), and antibodies against extracellular epitope of EPHB2R (Extra. EPHB2R Ab; EPHB2 antibody: 1 µg/ml, 2 h,  $n = 1872$ ,  $P < 0.001$ ) whereas it remained unaffected in patient IgG and ephrin-B2 ligand ( $n = 764$ ,  $P > 0.05$ ) or Control SNP793 IgG and ephrin-B2 ligand (5 µg/ml, 2 h, ephrin-B2 ligand: 125 ng/ml,  $n = 164$ ,  $P > 0.05$ ) conditions.

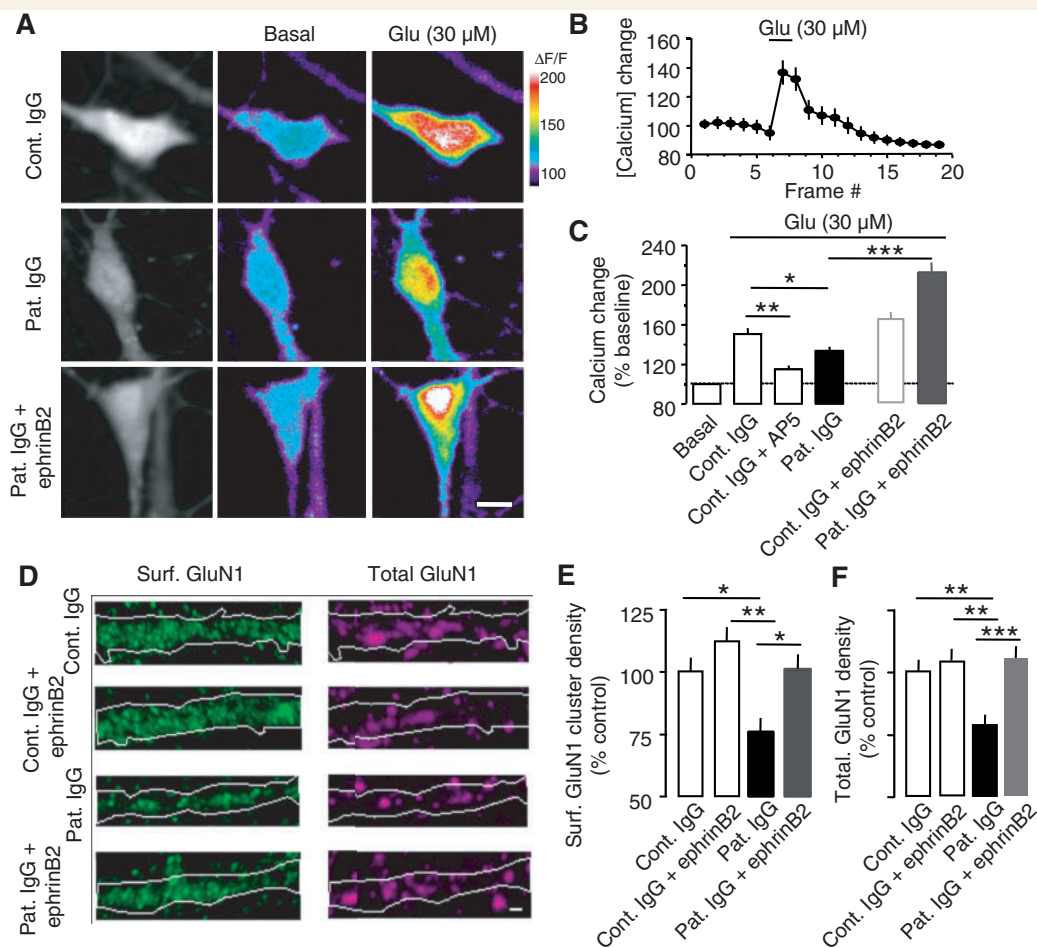
IgGs alone (Fig. 5E and F), Altogether, our findings confirm that patient IgG produced an internalization of NMDA receptors and further underline the role of the EPHB2R signalling in preventing this process.

To confirm these data in living animals, we injected in the dorsal hippocampus of adult mice controls or patient IgG (5–7 h incubation) in the presence or absence of ephrin-B2 ligand (Fig. 6A). As previously reported, injections of these IgGs in the brain of rats did not significantly alter the neuronal architecture (e.g. cell death rate) or the dendritic tree of pyramidal neurons (Hughes *et al.*, 2010). However, we observed that patient IgG reduced the surface staining (no permeabilization of the plasma membrane during immunohistochemical staining) of GluN1- (Fig. 6B and C) and GluN2A-NMDA receptors (Supplementary Fig. 5). Interestingly, this effect was partly reversed by the injection of ephrin-B2 ligands within the incubation period (Fig. 6B and C; Supplementary Fig. 5). Altogether, these data provide the first evidence that the deleterious effect of patient IgG on NMDA receptor surface dynamics

and content can be pharmacologically prevented, both *in vitro* and *in vivo*, by ephrin-B2 stimulation of EPHB2R and/or the formation of ephrin-B2–EPHB2R complexes.

## Discussion

The NMDA receptor plays a key role in several synaptic adaptation processes and dysfunctions of its signalling have been proposed as a core mechanism in several neurological disorders. Using high-resolution single nanoparticle imaging, we demonstrate that IgGs from patients with encephalitis and auto-NMDA antibodies, which cause neuropsychiatric symptoms in a reversible and titre-dependent manner, produce a differential effect on the two main GluN2A and GluN2B-containing NMDA receptor subtypes (Fig. 7). In the synapse, patient IgG induces a rapid dispersal of GluN2A-NMDA receptors, preventing their dynamic synaptic retention through the blockade of the interaction between

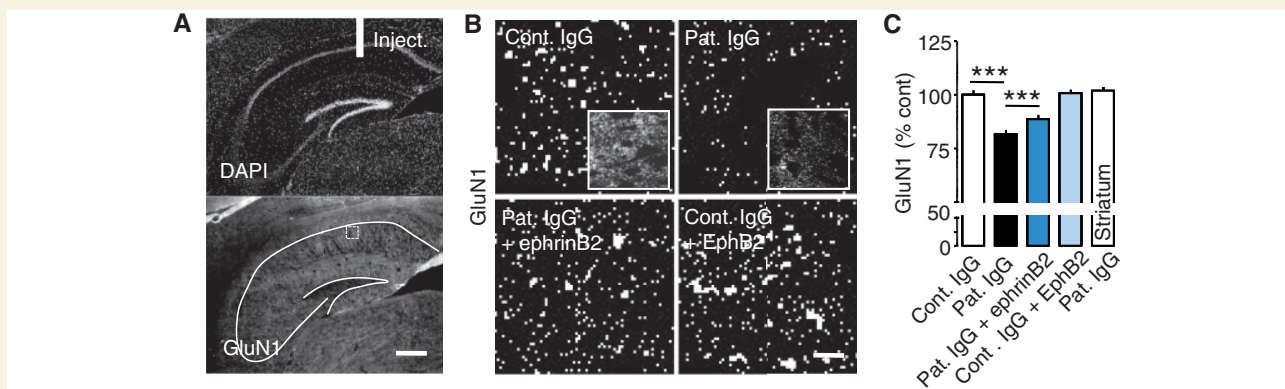


**Figure 5** Ephrin-B2 ligand-induced activation of EPHB2R reverses the effect of patient IgG on NMDA receptor function and cell surface expression. **(A)** Representative images of hippocampal neurons incubated 2–4 h either with control (5  $\mu$ g/ml), patient IgG (5  $\mu$ g/ml) or patient IgG and ephrin-B2 ligand (125 ng/ml, 45 min) under the basal conditions or after glutamate (30  $\mu$ M) stimulation. The pseudocolour representation shows the different intensity levels of the calcium indicator (Fluo4, 2  $\mu$ M) before and after the glutamate stimulation. Scale bar = 20  $\mu$ m. **(B)** Representative quantification of calcium intensity change ( $\Delta F/F$ ) after the glutamate stimulation of the hippocampal neuron in the presence of control IgG. **(C)** Relative comparison (per cent of basal) of a transient calcium rise induced by glutamate in neurons treated with control IgG ( $n = 57$  neurons), patient IgG ( $n = 55$ ), control IgG and ephrin-B2 ligand ( $n = 76$ ), patient IgG and ephrin-B2 ligand ( $n = 108$ ). The transient calcium rise was blocked in control condition by AP-5 (10  $\mu$ M) ( $n = 22$ ). **(D)** Representative images of hippocampal neurons treated for 20 h with Control SNP793 IgG (7  $\mu$ g/ml, *top row*), control IgG + ephrin-B2 ligand (*second row*), Patient 10-630 IgG (7  $\mu$ g/ml, *third row*), patient IgG + ephrin-B2 ligand (*bottom*) and immunostained for both surface NMDA GluN1 (green) and internalized NMDA GluN1 (purple). Scale bar = 1  $\mu$ m. **(E and F)** Quantitative comparison (per cent of control) of surface **(E)** and total **(F)** NMDA GluN1 cluster density between treatments, i.e. control IgG ( $n = 13$  neurons), control IgG + ephrin-B2 ligand ( $n = 10$  neurons), patient IgG ( $n = 14$  neurons), patient IgG + ephrin-B2 ligand ( $n = 15$  neurons). Surface and total GluN1 cluster densities were significantly decreased in the presence of patient IgG compared with control IgG ( $n = 14$  and 13,  $*P < 0.05$ ; and  $n = 14$  and 13,  $**P < 0.01$ , respectively), whereas such a decrease was prevented in the condition in which patient IgG and clustered ephrin were applied. Values represent the mean  $\pm$  SEM.

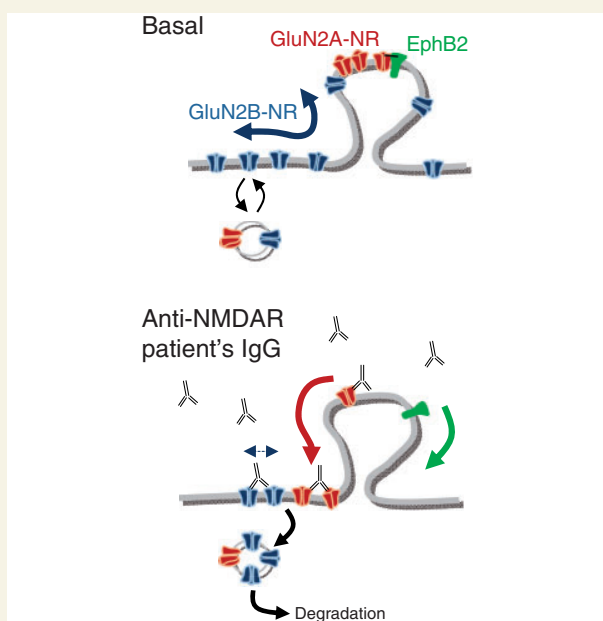
extracellular domains of GluN1/2 subunits and EPHB2R (Dalva *et al.*, 2000, 2007). In contrast, GluN2B-NMDA receptor dynamics were highly reduced in the extrasynaptic area, consistent with an antibody-induced receptor cross-linking and subsequent receptor endocytosis (Hughes *et al.*, 2010). Functionally, these drastic changes in GluN2-NMDA receptor surface dynamics abolished synaptic plasticity although the trafficking of other membrane receptors and channels, e.g. dopamine D1 receptor, GABA<sub>A</sub>R, Kv1.3

and AMPAR, remained mostly unaffected. Together, these data support a model in which the extracellular domain of NMDA receptors, which is the target in some patients with autoimmune antibody-induced neurological symptoms, plays an important role in the synaptic retention of NMDA receptors and in plasticity processes. Once the receptors escape the postsynaptic densities, they are extrasynaptically endocytosed in a GluN2 subunit-independent manner. Thus, the regulation of NMDA receptor





**Figure 6** Injection of EphrinB2 ligand *in vivo* reverses the effect of patient IgG on NMDA receptor cell surface expression. (A) Patient IgGs were injected in the dorsal hippocampus of FVB mice and 5–7 h after the injection, surface GluN1 subunits were immunostained (lower panel). Scale bar = 400  $\mu$ m. (B) Surface staining of GluN1 subunits in the CA1 area (stratum radiatum) of mice injected with either Control SNP793 IgG (1 mg/ml), Patient 09-052 IgG (1 mg/ml), Patient 09-052 IgG (1 mg/ml) + ephrin-B2 ligand (25  $\mu$ g/ml) or Control SNP793 IgG (1 mg/ml) + ephrin-B2 ligand (25  $\mu$ g/ml). GluN1 subunit clusters were observed and binarized on the images. Scale bar = 20  $\mu$ m. (C) Relative comparison (per cent of control, 2–5 mice per group) of GluN1 subunit surface staining between control IgG ( $n = 629$  clusters,  $n = 4$  mice), patient IgG ( $n = 826$  clusters,  $n = 5$  mice), patient IgG and ephrin-B2 ligand ( $n = 810$  clusters,  $n = 3$  mice) or control IgG and ephrin-B2 ligand ( $n = 863$  clusters,  $n = 2$  mice) or patient IgG in the striatum ( $n = 1063$  clusters,  $n = 5$  mice). Note the significant difference in cluster intensity between groups ( $***P < 0.001$ ).



**Figure 7** Proposed model of the impact of anti-NMDA receptor patient IgG on GluN2A- and GluN2B-NMDA receptor trafficking. In basal conditions, GluN2A-NMDA receptors are actively anchored in synapses in which their diffusion is rather restrained. GluN2B-NMDA receptors are more extrasynaptic and explore large dendritic areas. The patient IgG target extracellular domains of the GluN-NMDA receptors preventing the interaction between NMDA receptors and EphB2R in the synaptic area. In the extrasynaptic compartment, patient IgG dramatically reduces the surface diffusion of NMDA receptors, likely favouring their internalization and degradation.

surface trafficking emerges as a crucial cellular pathway involved in the pathophysiological tuning of excitatory synapse transmission.

Former pioneer studies have revealed that patient anti-NMDA receptor IgG targets surface GluN1-NMDA receptors and causes a selective and reversible decrease in GluN1-NMDA receptor surface density and synaptic localization (Dalmau *et al.*, 2008; Hughes *et al.*, 2010). The mechanism of this decrease was probably dependent on NMDA receptor internalization (Hughes *et al.*, 2010), which occurs mostly outside synapses (Blanpied *et al.*, 2002; Petralia *et al.*, 2003). Although these immunohistochemical and electrophysiological studies undoubtedly provide key information on the overall impact of patient anti-NMDA receptor IgG on NMDA receptor distribution, the spatial and time resolutions of these approaches did not provide insights into the molecular dynamics of the antibodies' surface targets, particularly in compartments with sub-wavelength sizes (e.g. synapse). Indeed, the detection threshold of classical immunocytochemical approaches is rather high ( $\sim >250$  nm in classical live imaging microscopy) and does not permit the investigation of single receptor populations since it detects only receptor populations. To overcome these limitations, we used real-time single particle tracking and imaging to elucidate the cellular pathways involving the IgGs of NMDA receptor encephalitis on NMDA receptor dysfunctions. Interestingly, quantum dot–receptor complex tracking can be performed over a long period of time in comparison with standard organic fluorophore–receptor complexes since quantum dots are photostable and do not photobleach (Dahan *et al.*, 2003; Groc *et al.*, 2004, 2007b). In addition, because quantum dots are smaller than the diffraction limits of an optical microscope, its image corresponds to a spread point function that can be fitted by a 2D Gaussian approximation. Consequently, quantum dot position could then be

determined with a point accuracy of  $\sim 30$  nm (Groc *et al.*, 2007b; Triller and Choquet, 2008), providing a rather unique way of exploring the lateral movement of single receptors in confined compartments with sub-wavelength precision (Triller and Choquet, 2005; Groc *et al.*, 2007b). Using this approach, we demonstrate that patient anti-NMDA receptor IgGs impact, in opposite manner, on the surface dynamics of synaptic GluN2A-NMDA receptors and extrasynaptic GluN2B-NMDA receptors. In the basal condition, surface GluN2B-NMDA receptors are quite dynamic and explore a large area of the dendritic tree (Groc *et al.*, 2006; Bard *et al.*, 2010). In the presence of patient anti-NMDA receptor IgGs, their diffusion was massively reduced, consistent with previously described antibody-induced cross-linking of surface receptors (Groc *et al.*, 2008; Heine *et al.*, 2008). In addition, this reduced surface diffusion in the extrasynaptic compartment likely results from an increase in endocytosis of the receptors (Tardin *et al.*, 2003). For synaptic GluN2A-NMDA receptors, the effect of patient anti-NMDA receptor IgG was strikingly different. In the basal conditions, GluN2A-NMDA receptors directly interact with intracellular PDZ domain-containing scaffold proteins (Lau and Zukin, 2007) and transmembrane EPHB2Rs (Dalva *et al.*, 2000), leading to a high synaptic retention of NMDA receptors. Surprisingly, patient anti-NMDA receptor IgG did not further stabilize GluN2A-NMDA receptors through a cross-linking process, but rather destabilized them by preventing their extracellular association with EPHB2R. It should be noted that these data do not rule out the possibility that patient anti-NMDA receptor IgGs also alter the interaction between the extracellular domain of NMDA receptors with other direct interactors, e.g. the neuroligin-like 1 transmembrane protein (Neto1) (Ng *et al.*, 2009). Together, the spatial and temporal resolutions of single particle tracking provided a unique way to unravel the molecular and cellular dynamics of the membrane targets of patient anti-NMDA receptor IgG, and actually delineated a new strategy to balance NMDA receptor dysfunction in patients with NMDA receptor autoantibody encephalitis.

The presence of NMDA receptor autoantibodies has also been reported in systemic lupus erythematosus (Lee *et al.*, 2009). In children, whose mothers suffer from systemic lupus erythematosus, NMDA receptor autoantibodies are suspected to cause multiple neurological and psychiatric disorders, such as congenital brain injuries, long-term cognitive deficits, psychosis, abnormal movements and respiratory failure. Although the origin is still unclear, these deficits can be triggered during the embryonic period of brain development by NMDA receptor autoantibodies in maternal circulation since the blood–brain barrier is not fully formed *in utero* (Lee *et al.*, 2009). In this developmental framework, most of the effects of the NMDA receptor autoantibodies are likely due to the targeting of GluN2B-NMDA receptors since they are predominant in the embryonic and early postnatal periods (Monyer *et al.*, 1994). In mature hippocampal networks, we show that both GluN2A- and GluN2B-NMDA receptor trafficking are affected by NMDA receptor autoantibodies, suggesting as previously reported (Dalmau *et al.*, 2008) that the targeting is the GluN1 subunit and not GluN2A or 2B subunits. Consistently, the interaction of EPHB2R and NMDA receptors, which is disrupted by NMDA receptor autoantibodies, is mediated by an extracellular

domain of GluN1 subunit (Dalva *et al.*, 2000). In the presence of NMDA receptor autoantibodies, the lateral escape of synaptic NMDA receptors, which are composed of a mixture of GluN2A-NMDA receptors and GluN1-GluN2A-GluN2B-NMDA receptors (Kohr, 2006), would thus result from the lack of interaction with stable synaptic interactor/anchor (e.g. EPHB2R). In the extrasynaptic compartment, NMDA receptor autoantibodies are likely to induce cross-linking of GluN-NMDA receptors, favouring their internalization and degradation. In contrast, when the NMDA receptor/EPHB2R interaction was induced by stimulation with ephrin-B2 ligands, NMDA receptors were more efficiently anchored in synapses and less sensitive to NMDA receptor autoantibodies. Among the various questions that such a discovery brings to our attention, one should be mentioned. It has been proposed that major neurological disorders (e.g. Huntington disease, ischaemia) result from an altered activation and/or trafficking of NMDA receptors. To date, trials that aim at preventing NMDA receptor dysfunction in such human disorders and their related animal models have, however, not reach our level of expectation since most of these drugs are not specific for a subtype of NMDA receptor (Javitt, 2004). Based on this study, it further emerges that rather than acting directly on the NMDA receptor channel or its activity, the development of molecules that will impact on NMDA receptor surface trafficking and synaptic retention may represent a potentially relevant strategy to balance NMDA receptor dysfunction in complex neurological disorders. As demonstrated earlier, ephrin-B2–EPHB2R-dependent signalling is a promising target, paving the way for the discovery of other relevant molecules.

In conclusion, the identification of the cellular pathways involved in such anti-NMDA receptor autoimmune disorders sheds new light on how neuronal communication can be preserved in severe neurological and psychiatric disorders involving NMDA receptor dysfunction. It further demonstrates how single nanoparticle tracking can be a powerful approach to dissect molecular and cellular cascades and isolate new therapeutic targets. It clearly points toward an extracellular regulation of the NMDA receptor trafficking in an acute model of encephalitis, consistent with the emerging role of the relationship between the extracellular matrix and the NMDA receptor surface trafficking (Groc *et al.*, 2007a; Michaluk *et al.*, 2009). Dysfunctions of NMDA receptor signalling are involved in several major neurological and psychiatric disorders and, although different primary intracellular or extracellular triggers may be involved in different pathologies, these may share downstream molecular cascades that lead to weak NMDA receptor synaptic retention and altered surface dynamics.

## Acknowledgements

We thank the patients for their participation, Christelle Breillat and Naura Chounlamountri for cell culture assistance, Philippe Legros, Christel Poujol (BIC Bordeaux) and Matthieu Sainlos for technical assistance and lab members for constructive discussions. Blood and CSF samples were collected with the help of Neurobiotec Bank and the Hospices Civils de Lyon.

## Funding

Agence Nationale de la Recherche (NMDASurf to L.G.); Centre National de la Recherche Scientifique; Institut National de la santé et de la Recherche Médicale; Conseil Régional d'Aquitaine and Bya Grant of the French Ministry of Health.

## Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

## References

- Ashby MC, Ibaraki K, Henley JM. It's green outside: tracking cell surface proteins with pH-sensitive GFP. *Trends Neurosci* 2004; 27: 257–61.
- Bannai H, Levi S, Schweizer C, Inoue T, Launey T, Racine V, et al. Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABAAR diffusion dynamics. *Neuron* 2009; 62: 670–82.
- Bard L, Groc L. Glutamate receptor dynamics and protein interaction: lessons from the NMDA receptor. *Mol Cell Neurosci* 2011; 48: 298–307.
- Bard L, Sainlos M, Bouchet D, Cousins S, Mikasova L, Breillat C, et al. Dynamic and specific interaction between synaptic NR2-NMDA receptor and PDZ proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 19561–6.
- Blanpied TA, Scott DB, Ehlers MD. Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. *Neuron* 2002; 36: 435–49.
- Chapman MR, Vause HE. Anti-NMDA receptor encephalitis: diagnosis, psychiatric presentation, and treatment. *Am J Psychiatry* 2011; 168: 245–51.
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004; 2004: re16.
- Dahan M, Levi S, Luccardini C, Rostaing P, Riveau B, Triller A. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science* 2003; 302: 442–5.
- Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 2008; 7: 1091–8.
- Dalmau J, Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R. Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDA receptor encephalitis. *Lancet Neurol* 2011; 10: 63–74.
- Dalmau J, Tuzun E, Wu HY, Masjuan J, Rossi JE, Voloschin A, et al. Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann Neurol* 2007; 61: 25–36.
- Dalva MB, McClelland AC, Kayser MS. Cell adhesion molecules: signaling functions at the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8: 206–20.
- Dalva MB, Takasu MA, Lin MZ, Shamah SM, Hu L, Gale NW, et al. EphB receptors interact with NMDA receptors and regulate excitatory synapse formation. *Cell* 2000; 103: 945–56.
- Groc L, Choquet D, Chaouloff F. The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation. *Nat Neurosci* 2008; 11: 868–70.
- Groc L, Choquet D, Stephenson FA, Verrier D, Manzoni OJ, Chavis P. NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein Reelin. *J Neurosci* 2007a; 27: 10165–75.
- Groc L, Lafourcade M, Heine M, Renner M, Racine V, Sibarita JB, et al. Surface trafficking of neurotransmitter receptor: comparison between single-molecule/quantum dot strategies. *J Neurosci* 2007b; 27: 12433–7.
- Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA, Lounis B, et al. Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci* 2004; 7: 695–6.
- Groc L, Heine M, Cousins SL, Stephenson FA, Lounis B, Cognet L, et al. NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 18769–74.
- Heine M, Groc L, Frischknecht R, Beique JC, Lounis B, Rumbaugh G, et al. Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science* 2008; 320: 201–5.
- Henderson JT, Georgiou J, Jia Z, Robertson J, Elowe S, Roder JC, et al. The receptor tyrosine kinase EphB2 regulates NMDA-dependent synaptic function. *Neuron* 2001; 32: 1041–56.
- Hughes EG, Peng X, Gleichman AJ, Lai M, Zhou L, Tsou R, et al. Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis. *J Neurosci* 2010; 30: 5866–75.
- Irani SR, Alexander S, Waters P, Kleopa KA, Pettingill P, Zuliani L, et al. Antibodies to Kv1 potassium channel-complex proteins leucine-rich, glioma inactivated 1 protein and contactin-associated protein-2 in limbic encephalitis, Morvan's syndrome and acquired neuromyotonia. *Brain* 2010; 133: 2734–48.
- Javitt DC. Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 984–97, 979.
- Kohr G. NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res* 2006; 326: 439–46.
- Lai M, Hughes EG, Peng X, Zhou L, Gleichman AJ, Shu H, et al. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Ann Neurol* 2009; 65: 424–34.
- Lai M, Huijbers MG, Lancaster E, Graus F, Bataller L, Balice-Gordon R, et al. Investigation of LGI1 as the antigen in limbic encephalitis previously attributed to potassium channels: a case series. *Lancet Neurol* 2010; 9: 776–85.
- Lancaster E, Huijbers MG, Bar V, Boronat A, Wong A, Martinez-Hernandez E, et al. Investigations of caspr2, an autoantigen of encephalitis and neuromyotonia. *Ann Neurol* 2011a; 69: 303–11.
- Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Titulaer MJ, Boulos M, Weaver S, Antoine JC, et al. Antibodies to metabotropic glutamate receptor 5 in the Ophelia syndrome. *Neurology* 2011b; 77: 1698–701.
- Lancaster E, Lai M, Peng X, Hughes E, Constantinescu R, Raizer J, et al. Antibodies to the GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. *Lancet Neurol* 2010; 9: 67–76.
- Lau CG, Zukin RS. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8: 413–26.
- Lebas A, Hussen B, Didelot A, Honnorat J, Tardieu M. Expanding spectrum of encephalitis with NMDA receptor antibodies in young children. *J Child Neurol* 2010; 25: 742–5.
- Lee JY, Huerta PT, Zhang J, Kowal C, Bertini E, Volpe BT, et al. Neurotoxic autoantibodies mediate congenital cortical impairment of offspring in maternal lupus. *Nat Med* 2009; 15: 91–6.
- Lim IA, Hall DD, Hell JW. Selectivity and promiscuity of the first and second PDZ domains of PSD-95 and synapse-associated protein 102. *J Biol Chem* 2002; 277: 21697–711.
- Lippincott-Schwartz J, Patterson GH. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 2003; 300: 87–91.
- Lu J, Helton TD, Blanpied TA, Racz B, Newpher TM, Weinberg RJ, et al. Postsynaptic positioning of endocytic zones and AMPA receptor cycling by physical coupling of dynamin-3 to Homer. *Neuron* 2007; 55: 874–89.
- Lu W, Man H, Ju W, Trimble WS, MacDonald JF, Wang YT. Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 2001; 29: 243–54.
- Manto M, Dalmau J, Didelot A, Rogemond V, Honnorat J. In vivo effects of antibodies from patients with anti-NMDA receptor encephalitis: further evidence of synaptic glutamatergic dysfunction. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 31.
- Manto MU, Laute MA, Aguera M, Rogemond V, Pandolfo M, Honnorat J. Effects of anti-glutamic acid decarboxylase antibodies

- associated with neurological diseases. *Ann Neurol* 2007; 61: 544–51.
- Mas N, Saiz A, Leite MI, Waters P, Baron M, Castano D, et al. Antiglycine-receptor encephalomyelitis with rigidity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; 82: 1399–401.
- Michaluk P, Mikasova L, Groc L, Frischknecht R, Choquet D, Kaczmarek L. Matrix metalloproteinase-9 controls NMDA receptor surface diffusion through integrin beta1 signaling. *J Neurosci* 2009; 29: 6007–12.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 1994; 12: 529–40.
- Morris RG. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *Eur J Neurosci* 2006; 23: 2829–46.
- Moscato EH, Jain A, Peng X, Hughes EG, Dalmau J, Balice-Gordon RJ. Mechanisms underlying autoimmune synaptic encephalitis leading to disorders of memory, behavior and cognition: insights from molecular, cellular and synaptic studies. *Eur J Neurosci* 2010; 32: 298–309.
- Ng D, Pitcher GM, Szilard RK, Sertie A, Kanisek M, Clapcote SJ, et al. Neto1 is a novel CUB-domain NMDA receptor-interacting protein required for synaptic plasticity and learning. *PLoS Biol* 2009; 7: e41.
- Nolt MJ, Lin Y, Hruska M, Murphy J, Sheffler-Colins SI, Kayser MS, et al. EphB controls NMDA receptor function and synaptic targeting in a subunit-specific manner. *J Neurosci* 2011; 31: 5353–64.
- Park M, Penick EC, Edwards JG, Kauer JA, Ehlers MD. Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science* 2004; 305: 1972–5.
- Park M, Salgado JM, Ostroff L, Helton TD, Robinson CG, Harris KM, et al. Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron* 2006; 52: 817–30.
- Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ. Internalization at glutamatergic synapses during development. *Eur J Neurosci* 2003; 18: 3207–17.
- Tai CY, Kim SA, Schuman EM. Cadherins and synaptic plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20: 567–75.
- Tardin C, Cognet L, Bats C, Lounis B, Choquet D. Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. *EMBO J* 2003; 22: 4656–65.
- Tovar KR, Westbrook GL. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci* 1999; 19: 4180–8.
- Triller A, Choquet D. Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes: and yet they do move! *Trends Neurosci* 2005; 28: 133–9.
- Triller A, Choquet D. New concepts in synaptic biology derived from single-molecule imaging. *Neuron* 2008; 59: 359–74.
- Vincent A, Irani SR, Lang B. The growing recognition of immunotherapy-responsive seizure disorders with autoantibodies to specific neuronal proteins. *Curr Opin Neurol* 2010; 23: 144–50.
- Wang Z, Edwards JG, Riley N, Provance DW Jr, Karcher R, Li XD, et al. Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. *Cell* 2008; 135: 535–48.
- Wenthold RJ, Prybylowski K, Standley S, Sans N, Petralia RS. Trafficking of NMDA receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003; 43: 335–58.
- Yashiro K, Philpot BD. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* 2008; 55: 1081–94.
- Zhang Q, Tanaka K, Sun P, Nakata M, Yamamoto R, Sakimura K, et al. Suppression of synaptic plasticity by cerebrospinal fluid from anti-NMDA receptor encephalitis patients. *Neurobiol Dis* 2012; 45: 610–5.



## Supplementary figure legends

**Suppl. Fig. 1** Representative images of a hippocampal neuron transfected with GluN2A-SEP (surface GluN2A subunit labelling) and Homer 1c-DsRed (postsynaptic density marker). Note on the overlay image that GluN2A subunits are concentrated in postsynaptic densities. Scale bar upper panels = 10  $\mu\text{m}$ . Scale bar lower panel = 300 nm.

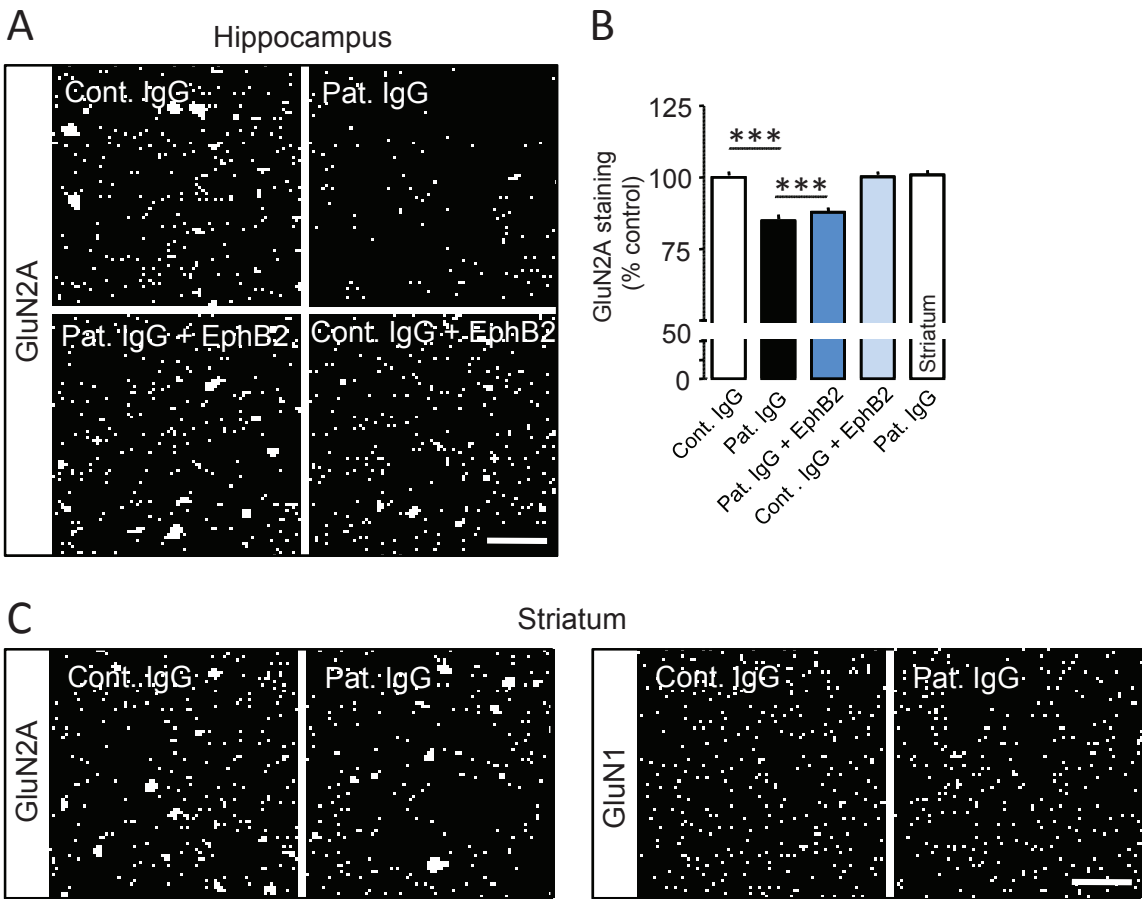
**Suppl. Fig. 2** Patients' cerebrospinal fluid (CSF) does not affect the glutamate synapse density (Homer clusters). Left panel, dendritic fragments of hippocampal neurons transfected with Homer 1c-DsRed and incubated with either controls' ('SNP 793', 1/300, 20 hours) or patients' ('09-049', 1/300, 20 hours) CSF. Scale bar = 4  $\mu\text{m}$ . Right panel, linear density (number of cluster per  $\mu\text{m}$ ) of Homer clusters along dendrites in controls' (mean  $\pm$  sem:  $0.44 \pm 0.03$  cluster/ $\mu\text{m}$ ,  $n = 133$  clusters) and patients' ( $0.45 \pm 0.03$  cluster/ $\mu\text{m}$ ,  $n = 326$  clusters) CSF conditions ( $P > 0.05$  between groups).

**Suppl. Fig. 3** Patients' IgGs bind surface GluN1-NMDAR. **(A)** Example of surface immunostaining based on patients' IgGs ('09-052', 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (upper panel). Patients' IgGs was first incubated, followed by Alexa 488-coupled secondary antibody against human IgG (II<sup>ary</sup> Ab-Alexa 488). Note the cluster-type immunostaining. When using controls' IgGs ('SNP793', 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) no surface staining was observed (lower panel) although neurons were present (differential interference contrast DIC image). Scale bar = 12  $\mu\text{m}$ . **(B)** Surface immunodetection of the patients' IgGs ('09-052') or endogenous GluN1-NMDAR. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ . Note that the two staining show good, although not total, overlap. Higher concentrations of either primary antibodies do not change the overall level of colocalization. **(C)** Surface immunodetection of the patients' IgGs ('09-052') or postsynaptic density protein Shank with an overlay image. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ .

**Suppl. Fig. 4** Single nanoparticle tracking of patients' IgGs surface targets in hippocampal neurons. (A) Schematic representation of the labelling of the surface target of patients' IgGs using the single QD complex approach (left panel). Representative patients' ('09-052') IgGs-QD trajectories (yellow lines, 1000 frames, 50 ms acquisition) on cultured hippocampal neurons (days *in vitro* 16). Scale bar = 10  $\mu$ m. (B) Representative trajectory (from the field shown in A) of surface patients' IgGs-QD complex in the vicinity and within a synapse (labelled by Mitotracker). Scale bar = 300 nm. (C) Immobile fraction (diff. coeff. < 0.0075  $\mu$ m<sup>2</sup>/s) of patients' IgGs (n = 3491 trajectories), GluN2A subunit (n = 2877), GluN2B subunit (n = 2780), GluA1 subunit (n = 2679),  $\alpha$ 2 GABA<sub>A</sub> (n = 1284), or EphB2R (n = 1891) trajectories. Note that the patients' IgGs-QD distribution corresponds to a mixt of the GluN2A and GluN2B subunit ones.

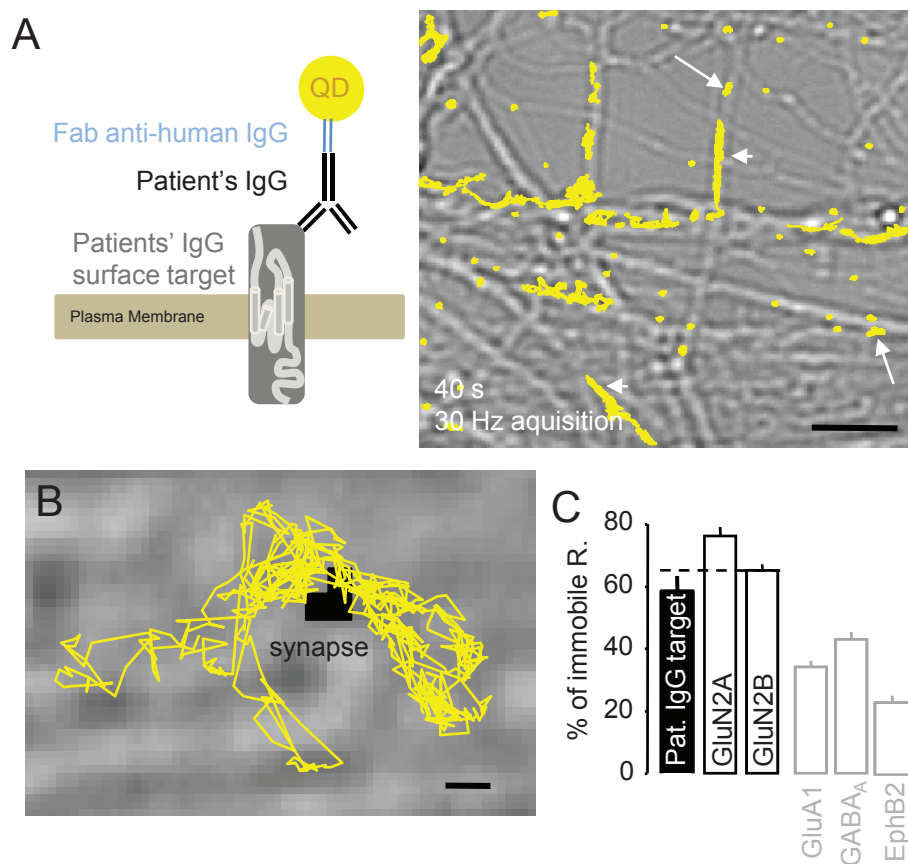
**Suppl. Fig. 5** Patients' IgGs injected in dorsal hippocampus reduces the membrane expression of GluN2A-NMDAR. (A) Controls' IgGs, patients' IgGs, patients' IgGs and ephrinB2 ligand, or controls' IgGs and ephrinB2 ligand were injected in the dorsal hippocampus of FVB mice. 5-7h after the injection, surface GluN2A subunit were immunostained in the CA1 area (*stratum radiatum*). GluN2A subunit clusters were clearly observed and binarized on the images. Scale bar = 20  $\mu$ m. (B) Relative comparison (percent of control) of GluN2A subunit surface staining between controls' IgGs ('SNP793', 1 mg/ml, n = 739 clusters), patients' IgGs ('09-052', 1 mg/ml, n = 836 clusters), patients' IgGs and ephrinB2 ligand ('09-052', 1 mg/ml, ephrinB2 ligand: 25  $\mu$ g/ml, n = 964 clusters), controls' IgGs and ephrin B2 ligand ('SNP793', 1 mg/ml, ephrinB2 ligand: 25  $\mu$ g/ml, n = 1088 clusters), or patients' IgGs in the striatum (n = 563 clusters). Note the significant difference between groups ( $P < 0.001$ ). (C) Surface GluN2A and GluN1 subunit staining in the striatum of controls' and patients' IgGs. Scale bar = 20  $\mu$ m.

Suppl. Fig. 5  
Mikasova et al.

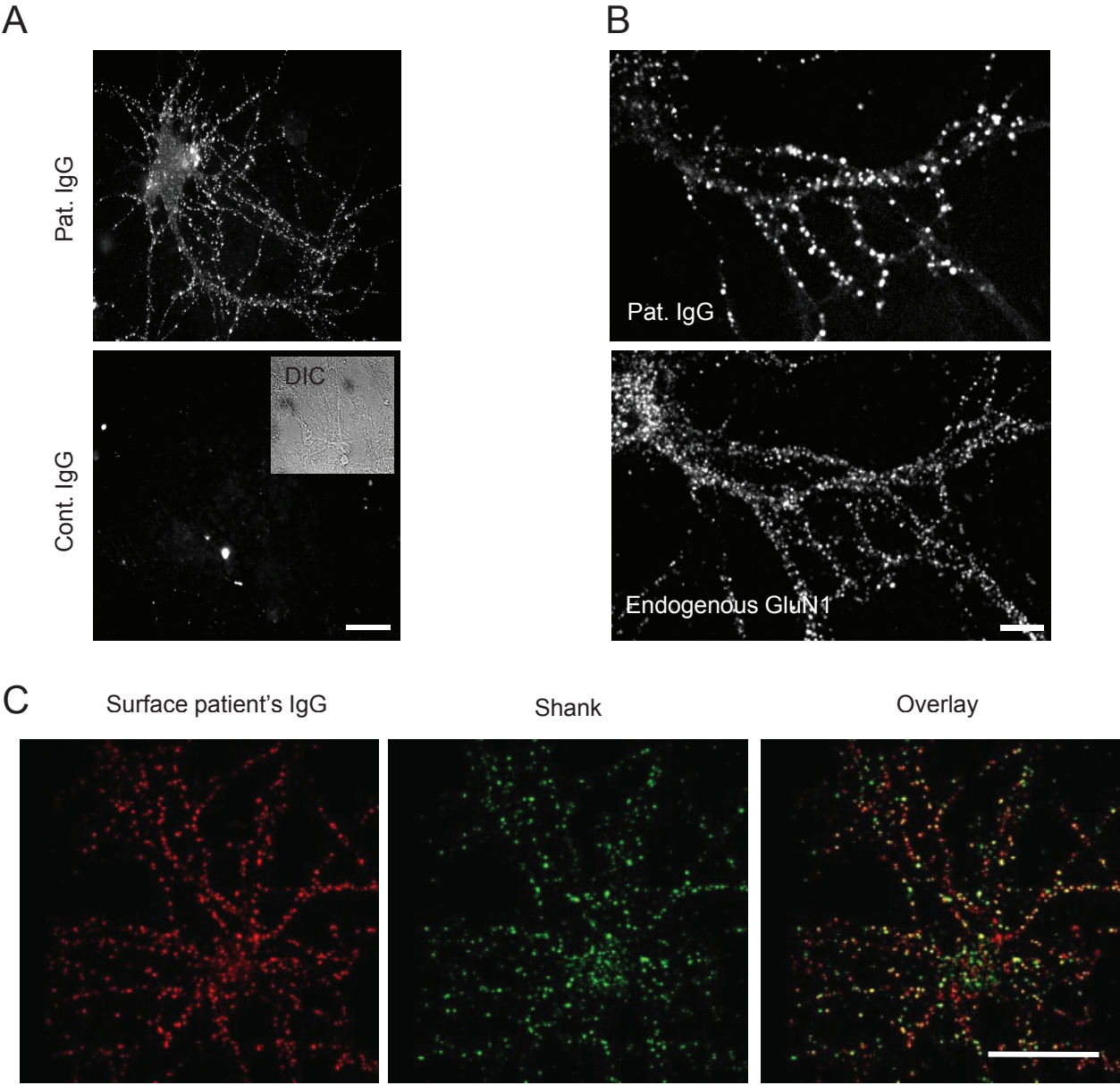




# Suppl. Fig. 4 Mikasova et al.

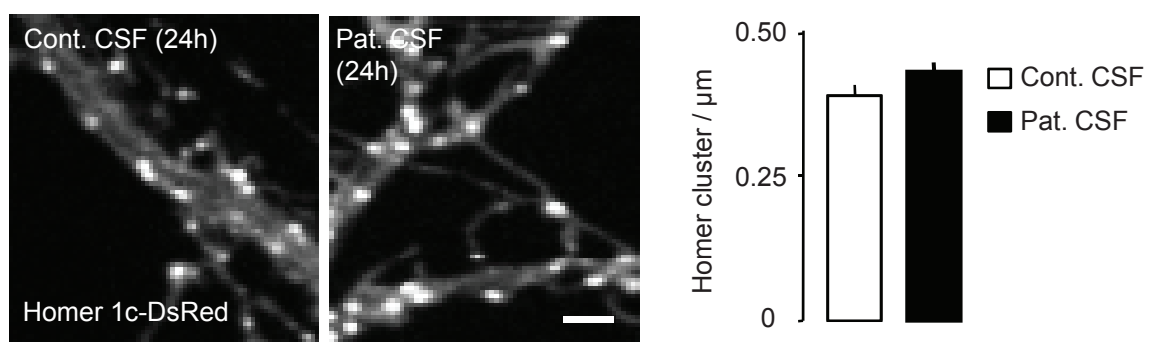


Suppl. Fig. 3  
Mikasova et al.



## Suppl. Fig. 2

Mikasova et al.



Suppl. Fig. 1  
Mikasova et al.

